

---

---

# BCC

---

---

## biochimica clinica

**In questo numero:**

**IL SYLLABUS DI EFLM  
PER LA FORMAZIONE POST-LAUREA**

*vedi pag. 247*

**DOCUMENTI SIBioC**

**Fase pre-analitica per la misura della glicemia  
Monitoraggio terapeutico dei farmaci anti TNF $\alpha$**

*vedi pag. 263, 266*



SIBioC - Medicina di Laboratorio  
membro di

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)  
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)



 **BIOMEDIA**  
La condivisione del sapere

**RAGGIUNGETE UNA INTEGRAZIONE  
DI LABORATORIO SENZA PRECEDENTI  
CON ALINITY – LA NOSTRA NUOVA  
FAMIGLIA DI SISTEMI ARMONIZZATI**



Alinity è la soluzione totale di sistemi di nuova generazione, progettati per semplificare le vostre attività e fornirvi un livello di integrazione senza precedenti in tutte le discipline del laboratorio.

Alinity ci, la famiglia di sistemi integrati per immunometria e chimica clinica, ha la capacità di trasformare il vostro laboratorio in un modello di efficienza e prestazioni, aiutando voi e la vostra struttura a raggiungere prestazioni sanitarie significativamente migliori.

**Per maggiori informazioni visitate [Alinity.com](http://Alinity.com), inviate una email a [wired@abbott.com](mailto:wired@abbott.com) o chiedete al vostro Ambassador.**



**CHOOSE TRANSFORMATION**

# sommario

3

## EDITORIALE

189

Il Syllabus di EFLM per la formazione post-laurea dei professionisti Europei: una preziosa opportunità per la definizione a livello europeo dello Specialista in Medicina di Laboratorio  
*A. Mosca, M.S. Graziani*

## RASSEGNE

191

La diagnosi di malaria: ruolo dell'esame emocromocitometrico nello screening  
*R. Rolla, G. Da Rin, V. Granero, F. Dima, A. Fanelli, S. Francione, C. Ortolani, S. Pipitone, S. Buoro, a nome del Gruppo di Studio Diagnostica Ematologica Integrata*

210

Shaping the epigenetic basis of Werner Syndrome  
*T. Guastafierro, M.G. Bacalini, D. Raimondo, A. Marcocchia, C. Franceschi, A. Spanò, F. Bondanini*

## CONTRIBUTI SCIENTIFICI

217

Determinazione del perampanel plasmatico: confronto e cross-validazione tra due metodi in cromatografia liquida ad elevate prestazioni con rivelatore spettrofluorimetrico e con rivelatore a spettrometria di massa  
*A. D'Urso, F. Fontana, I. Gabriele, F. Gilardoni, V. De Riva, G. Contarato, F. Ranzato, E. Galloni, U. de Grazia*

225

L'ormone anti-Mülleriano come marcatore di scarsa risposta alla stimolazione ovarica  
*E. Ciulla, A. M. D. Boria, S.L. Levi, A. Ottolenghi, T. Pescatori*

234

Glycated albumin is correlated to insulin resistance and  $\beta$ -cell secretory function in subjects at risk of developing diabetes  
*C. Bellia, M. Zaninotto, C. Cosma, L. Agnello, B. Lo Sasso, P. Altavilla, G. Bivona, G. Pizzolanti, S. Bernardini, M. Plebani, M. Ciaccio*

240

Valutazione dei valori di emoglobina glicata in presenza di anemia sideropenica: risultati di uno studio retrospettivo osservazionale  
*J. Intra, G. Limonta, F. Cappellini, M. Bertona, P. Brambilla*

## DOCUMENTI

247

Il Syllabus EFLM per la formazione post-laurea per specialisti in medicina di laboratorio: versione n 5 (2018)  
*N. Jassam, J. Lake, M. Dabrowska, J. Queralto, D. Rizos, R. Lichtinghagen, H. Baum, F. Ceriotti, J. O'Mullane, E. Homšak, C. Charilaou, M. Ohlson, I. Rako, D. Vitkus, G. Kovac, P. Verschuure, J. Racek, M.C. Chifiriuc, G. Wieringa*

## DOCUMENTI SIBioC

263

Raccomandazioni per l'ottimizzazione della fase pre-analitica per una corretta determinazione della glicemia in ambito diabetologico  
*G. Bonetti, M. Carta, A. Lapolla, R. Miccoli, R. Testa, A. Mosca in qualità di delegati SIBioC, Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) e Società Italiana di Diabetologia (SID) e per il Gruppo di Studio SIBioC-SIPMeL Diabete Mellito*

266

Efficacia e utilità del monitoraggio terapeutico di autoanticorpi e farmaci inibitori del Tumor Necrosis Factor alpha in pazienti in trattamento per patologie autoimmuni  
*V. Pecoraro, T. Trenti, C. Bonaguri, A. Melegari, E. De Santis, B. Lo Sasso, U. Basile per il Gruppo di Studio SIBioC Autoimmunità e Immunologia Clinica*

## RECENSIONI

274

Quando ti porti il lavoro a casa: leggendo "Tossicologia! Perché ciò che non conosci ti può uccidere" di Alan Wu. Traduzione Italiana di Mario Plebani e Mariela Marinova  
*R. Pacifici*

---

# sommario

---

## CASI CLINICI

**e33**

La misura delle catene leggere libere e i recenti criteri diagnostici del mieloma multiplo  
*L. Fringuelli, R. Buzzi, R. Carrozza, G. Trapè, M. Montanaro, M.T. Muratore*

**e37**

Ruolo del laboratorio nella valutazione di un donatore di organi con sospetta emofilia A  
*E. Milletti, C. Bellini, F. Cinci, E. Franceschini, D. Fineschi, R. Guerranti, A. Silviotti, D. Vannoni, L. Terzuoli, R. Leoncini, C. Scapellato, G. Ippoliti, P. Calzoni*

**e40**

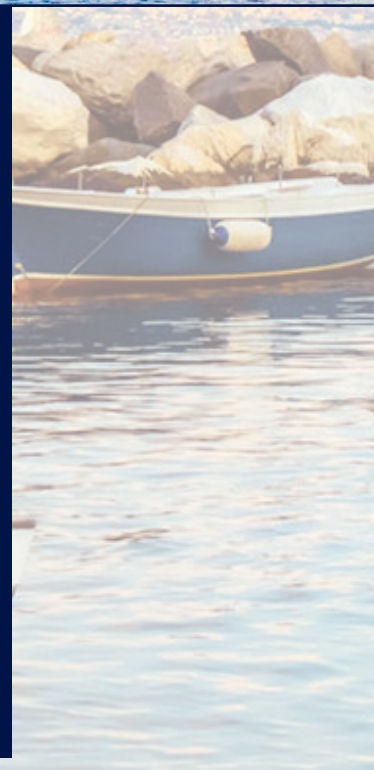
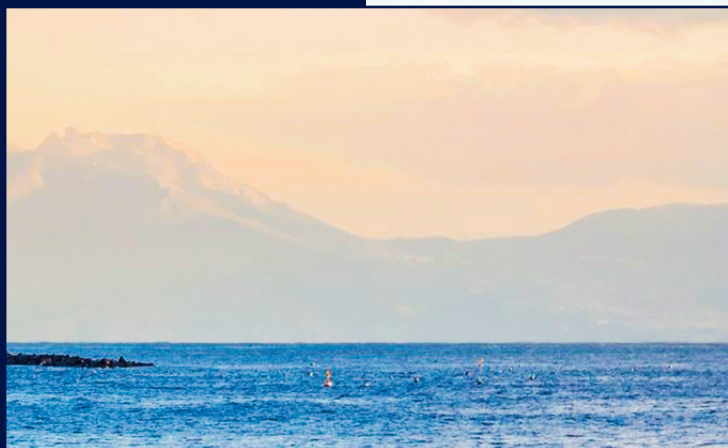
Utilità della determinazione della frazione delle piastrine immature nella diagnostica delle trombocitopenie autoimmuni  
*B. Manenti, M. Seghezzi, P. Dominoni, Lorenzo Cerutti, Sabrina Buoro*

**e43**

L'utilità della revisione microscopica nella diagnostica della malaria: un'infezione sub-microscopica da *Plasmodium falciparum*  
*V. Granero, E. Peyronel, M.A. Caserta, C. Condò, G.A. Cibinel, R. Angilletta, M.R. Cavallo*



save the date



# 50° Congresso Nazionale

SIBioC-Medicina di Laboratorio  
Società Italiana di Biochimica Clinica  
e Biologia Molecolare Clinica

Innovazione  
nella Medicina di Laboratorio

NAPOLI, 16-18 Ottobre 2018  
*Città della Scienza*

# biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti  
e già diretta da Carlo Franzini

## Rivista della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica - Medicina di Laboratorio

membro di

**International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)**  
**European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)**

*Biochimica Clinica* è indicizzata in Scopus ([www.info.scopus.com](http://www.info.scopus.com)), EMBASE ([www.info.embase.com](http://www.info.embase.com))  
Engineering Village ([www.ei.org](http://www.ei.org)), Reaxys ([www.info.reaxys.com](http://www.info.reaxys.com)) e ESCI ([www.wokinfo.com/products\\_tools/multidisciplinary/esci](http://www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci))  
*Biochimica Clinica* is indexed in Scopus ([www.info.scopus.com](http://www.info.scopus.com)), EMBASE ([www.info.embase.com](http://www.info.embase.com))  
Engineering Village ([www.ei.org](http://www.ei.org)), Reaxys ([www.info.reaxys.com](http://www.info.reaxys.com)) and ESCI ([www.wokinfo.com/products\\_tools/multidisciplinary/esci](http://www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci))

### Editor-in-Chief

Maria Stella Graziani

### Reviews Editor

Martina Zaninotto

### Associate Editors

Ferruccio Ceriotti  
Davide Giavarina  
Bruna Lo Sasso  
Giampaolo Merlini  
Martina Montagnana  
Andrea Mosca  
Paola Pezzati  
Rossella Tomaiuolo  
Matteo Vidali

### International Advisory Board

Khosrow Adeli *Canada*  
Sergio Bernardini *Italy*  
Marcello Ciaccio *Italy*  
Eleftherios Diamandis *Canada*  
Kjell Grankvist *Sweden*  
Hans Jacobs *The Netherlands*  
Eric Kilpatrick *UK*  
Magdalena Krintus *Poland*  
Giuseppe Lippi *Italy*  
Howard Morris *Australia*  
Mario Plebani *Italy*  
Sverre Sandberg *Norway*  
Ana-Maria Simundic *Croatia*  
Jill Tate *Australia*  
Tommaso Trenti *Italy*  
Cas Weykamp *The Netherlands*  
Maria Wilrich *USA*  
Paul Yip *Canada*

### Editorial Secretary

Lucrezia Monterisi  
[biochimica.clinica@sibioc.it](mailto:biochimica.clinica@sibioc.it)  
Biomedica srl  
Via L. Temolo 4  
20126 Milano  
Tel. 0245498282  
Fax 0245498199  
[www.bc.sibioc.it](http://www.bc.sibioc.it)

### Responsible Editor

Giuseppe Agosta

### Publisher

Biomedica srl  
Via L. Temolo 4  
20126 Milano  
[www.biomedica.net](http://www.biomedica.net)

### SIBioC Executive Board 2018-2019

Fiamma Balboni  
Umberto Basile  
Sergio Bernardini *Presidente*  
Marcello Ciaccio *Past President*  
Giorgio Da Rin  
Davide Farci Santarcangeli  
Martina Montagnana  
Michele Mussap  
Antonello Nonnato  
Laura Sciacovelli  
Martina Zaninotto

### Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

Biomedica srl  
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano  
Tel. 0245498282 - Fax. 0245498199



utilizza un Sistema di  
Gestione Qualità  
Certificato per l'attività di

Fornitura di servizi per la progettazione,  
realizzazione e distribuzione di prodotti editoriali

## Volume 42

Numero 3 - Settembre 2018

Autorizzazione del Tribunale di Milano  
n. 40 del 2.02.1987

### Grafica e impaginazione

Biomedica srl  
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

### Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl  
20040 Usmate (MI)

Abbonamento annuo  
Euro 50 per Italia/Privati  
Euro 75 per Italia/Enti  
Euro 75 per Estero/Privati  
Euro 90 per Estero/Enti

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

Spedizione in abbonamento postale  
D.L. 353/2003 (conv. in L. 27/02/2004  
n. 46) art. 1, comma 1, LO/MI

Associato all'USPI  
Unione Stampa  
Periodica Italiana  
Tiratura di questo  
numero 2000 copie  
2000 copies of this  
issue have been printed  
ISSN 0393-0564



L'utilizzo degli estratti dei lavori pubblicati è  
consentito esclusivamente per uso personale  
e non può essere in alcun modo esteso ad  
altri impieghi (commerciali, pubblicitari, ecc).  
La SIBioC - Medicina di Laboratorio si riserva  
di perseguire eventuali utilizzi impropri.

## Il Syllabus di EFLM per la formazione post-laurea dei professionisti Europei: una preziosa opportunità per la definizione a livello europeo dello Specialista in Medicina di Laboratorio

Andrea Mosca<sup>1</sup>, Maria Stella Graziani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano

<sup>2</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

L'emanazione della Direttiva Europea 2013/55 EU The recognition of professional qualifications (1,2) e la sua successiva trasposizione nelle leggi nazionali ha consentito o consentirà nel prossimo futuro lo sviluppo di un meccanismo di mutuo riconoscimento delle qualifiche professionali all'interno degli Stati membri. Questo faciliterà enormemente il libero scambio dei professionisti all'interno della Unione Europea (UE) ovviando alla necessità per i singoli Stati di prevedere misure di compensazione (come ad esempio ulteriori periodi di formazione, acquisizione di nuove qualifiche, esami finali e così via) per i professionisti che decidessero di spostarsi ad operare da un Paese all'altro. Queste misure sono tanto più necessarie all'interno della nostra professione dove operano anche specialisti non medici per i quali era mancato fino a ora questo tipo di riconoscimento, mentre i medici (come altre professioni come ad esempio gli infermieri, gli architetti, gli avvocati) già ne usufruivano. A tal proposito, si ricorda anche che nelle varie nazioni della UE la professione del laboratorista è attualmente accessibile a diverse figure di laureati. Ad esempio in Francia è esercitata quasi esclusivamente dai laureati in Farmacia, in Austria solo dai laureati in Medicina e Chirurgia, in Croazia e Slovenia solo dai laureati non medici, e così via. Questa possibilità di mutuo riconoscimento era quindi per la nostra professione, assolutamente necessario.

Nel riconoscere che misure di salvaguardia devono essere adottate per assicurare la fornitura di servizi di elevata qualità e garantire al contempo la massima sicurezza e i migliori esiti per il paziente, indipendentemente dal Paese dove le prestazioni vengono fornite, la Direttiva chiede la creazione di un percorso comune di formazione (Common Training Framework, CTF) che possa essere mutualmente riconosciuto all'interno della UE. EFLM, pur riconoscendo che un CTF non possa sostituirsi ai

programmi nazionali di formazione post-laurea (ma ipotizzando che questa possa anche essere una opportunità da perseguire), ha valutato da tempo che esista uno scopo comune all'interno di tali percorsi formativi tale da consentire la costruzione di un Syllabus comune che possa essere recepito come la posizione ufficiale della Federazione. EFLM, attraverso il suo Committee on Profession ha lavorato da lungo tempo a questo progetto predisponendo negli anni diverse versioni del Syllabus fino alla quarta versione del 2012 (3).

Strettamente legata alla emanazione del Syllabus è la creazione del "Register of Specialists in Laboratory Medicine" (EuSpLM). Il registro è il database EFLM degli Specialisti Europei in Medicina di Laboratorio che identifica i professionisti che posseggono determinati requisiti educazionali e formativi, definendo al contempo il codice etico che gli iscritti devono mantenere nell'esercizio della loro professione. Gli iscritti al Registro acquisiscono l'opportunità di poter lavorare all'interno dei paesi della UE, senza dover sottostare a misure compensative. Maggiori dettagli sul Registro e informazioni sulle modalità di iscrizione possono essere recuperati sul sito di EFLM (<https://www.eflm.eu/site/page/a/1305>).

*Biochimica Clinica* propone in questo numero la traduzione della versione 5 del Syllabus (4), il cui testo originale è accessibile come materiale supplementare sul sito delle riviste (1S). La versione corrente, rispetto alla precedente, dettaglia maggiormente i requisiti all'interno delle singole discipline e vi aggiunge le tecniche analitiche innovative e la conoscenza delle tecniche statistiche. Viene anche proposta una struttura per il percorso di formazione nonché le rispettive responsabilità del discente e dei docenti. Questo "log book" è pure disponibile come materiale supplementare sia nella versione originale (2S) che nella traduzione Italiana (3S). Questa posizione ufficiale di EFLM intende

Ricevuto: 09.07.2018

Revisionato: 09.07.2018

Accettato: 09.07.2018

Pubblicato on-line: 17.07.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.039

essere di supporto per il CTF, e agli obiettivi della direttiva, nella salvaguardia della mobilità professionale all'interno dei Paesi europei, in un momento storico nel quale si assiste ad un aumento della domanda di professionisti qualificati accompagnata peraltro da una diseguale distribuzione degli stessi (5).

La traduzione del Syllabus è preceduta da una presentazione di Gilbert Wieringa, Chair del Profession Committee di EFLM.

Per quanto riguarda le Scuole di Specializzazione in Patologia Clinica e Biochimica Clinica che vi sono in Italia (in totale se ne contano 32 accreditate dal Ministero della Salute), questo documento è da ritenersi di grande rilievo, e non potrà non influenzare i programmi futuri delle stesse. Probabilmente potrà servire anche come spunto anche per la sperimentazione di nuove forme di didattica (ad esempio come formazione a distanza) e/o per l'organizzazione di nuovi eventi formativi, al di là delle attuali modalità messe a disposizione dalle Società Scientifiche interessate.

L'omogeneizzazione dei percorsi formativi in medicina di laboratorio è ritenuta così necessaria che anche IFCC ha elaborato un proprio suggerimento relativo ai contenuti che la formazione specialistica dovrebbe avere. Tale percorso, accessibile presso il sito di IFCC (6) non ha ovviamente per i professionisti europei la stessa valenza formale che attiene al Syllabus di EFLM, ma tuttavia può costituire un importante elemento culturale e di confronto.

Confidiamo che fornire ai lettori di *Biochimica Clinica* la traduzione del Syllabus possa contribuire a far meglio conoscere alla comunità professionale Italiana l'impegno di EFLM a concorrere alla creazione di percorsi formativi comuni con il fine ultimo di omogeneizzare in Europa le conoscenze e le competenze che permetteranno la creazione dello Specialista Europeo in Medicina di Laboratorio.

## BIBLIOGRAFIA

1. European Parliament and EU Council. Directive 2013/55/EU of the European Parliament and of the Council of 20 November 2013 amending Directive 2005/36/EC on the recognition of professional qualifications and Regulation (EU) No 1024/2012 on administrative cooperation through the Internal Market Information System ('the IMI Regulation') 2013. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2013:354:TOC> (Ultimo accesso luglio 2018)
2. Jassam N, Wieringa G. La Direttiva Europea 2005/36/EC: un nuovo orizzonte per le professioni all'interno della Comunità Europea. *Biochim Clin* 2014;38:656-8.
3. Wieringa G, Zerah S, Jansen R, Simundic AM, et al. The EC4 European syllabus for post-graduate training in clinical chemistry and laboratory medicine: version 4 - 2012. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1317-28.
4. Jassam N, Lake J, Dabrowska M, et al. The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine syllabus for postgraduate education and training for Specialists in Laboratory Medicine: version 5 - 2018. *Clin Chem Lab* 2018 doi: 10.1515/ccim-2018-0344. (Ultimo accesso luglio 2018).
5. European Commission Press release. Commissioner Michel Barnier welcomes the trilogue agreement on the modernisation of the Professional Qualifications Directive. Memo [serial on the Internet]. 2013: Available from: [http://europa.eu/rapid/pressrelease\\_MEMO-13-552\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/pressrelease_MEMO-13-552_en.htm) (ultimo accesso luglio 2018).
6. The IFCC curriculum. <http://www.ifcc.org/media/477173/2017-ifcc-curriculum.pdf>. (Ultimo accesso luglio 2018)

## La diagnosi di malaria: ruolo dell'esame emocromocitometrico nello screening

Roberta Rolla<sup>1</sup>, Giorgio Da Rin<sup>2</sup>, Valentino Granero<sup>3</sup>, Francesco Dima<sup>4</sup>, Alessandra Fanelli<sup>5</sup>, Sara Francione<sup>6</sup>, Claudio Ortolani<sup>7</sup>, Silvia Pipitone<sup>8</sup>, Sabrina Buoro<sup>9</sup> a nome del Gruppo di Studio di Diagnostica Ematologica Integrata

<sup>1</sup>Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara

<sup>2</sup>Medicina di Laboratorio, Ospedale di Bassano del Grappa (VI), ASL 7 Pedemontana

<sup>3</sup>Laboratorio Analisi Unificato Rivoli-Pinerolo ASL TO3, Pinerolo (TO)

<sup>4</sup>Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliero Universitaria Integrata di Verona

<sup>5</sup>Laboratorio Generale, Università-Ospedale Careggi, Firenze

<sup>6</sup>Laboratorio Analisi, ASL NO, Borgomanero (NO)

<sup>7</sup>Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino

<sup>8</sup>Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

<sup>9</sup>Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

### ABSTRACT

**The diagnosis of malaria: the role of the haematology analyzers as first level screening.** Malaria is one of the three most common infectious diseases worldwide, and is caused mainly by four species of *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale*. The disease is endemic in developing countries but it is also gradually involving Western Countries like Italy. Albeit in 1970 the World Health Organization has included Italy among the malaria-free countries, malaria has become the most frequently imported tropical disease. Microscopic examination of the peripheral blood smear is the gold standard for diagnosing malaria. Although this test is quick, cheap and readily applicable, it has also some drawbacks such as low sensitivity and the need of qualified personnel. Therefore, an effective screening test for detecting malaria in cases with low clinical suspicion or characterized by non-specific symptoms is increasingly necessary, especially in Countries where the disease is not endemic. A new generation of hematological analyzers, whose performance may be potentially useful for the screening of subjects with suspected malaria infection has made available. Many fully-automated hematological analyzers, using different techniques (optical-cytochemical, optical fluorescence, multiangle polarized dispersion and volume-conductance-scatter), can now identify the presence of the malarial parasites in peripheral blood, producing specific cell distributions. The blood count can hence be regarded as a new diagnostic opportunity in malaria infection, since it is one of the basic investigations performed in febrile patients, and is also a simple and fast test, that can be performed in virtually all clinical laboratories.

### INTRODUZIONE

La malaria è una delle tre malattie infettive più diffuse nel mondo, insieme alla tubercolosi e all'HIV, e rappresenta uno dei grandi problemi sanitari mondiali, soprattutto in Africa. In questo continente infatti la malaria rappresenta la maggior causa di morte nei bambini sotto i 5 anni (1).

Cinque specie di parassita della malaria causano manifestazioni cliniche nell'uomo: *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e in specifiche parti del Sud Est asiatico, il *P. knowlesi*. Le infezioni

causate da *P. falciparum* e *P. knowlesi* sono le più gravi e potenzialmente letali, pertanto la loro identificazione per il trattamento dei pazienti infetti, diventa particolarmente importante (1); occasionalmente anche il *P. vivax* può causare malaria grave e complicata, specialmente nei pazienti più anziani (1).

La maggior parte delle infezioni malariche nell'uomo sono dovute a quattro specie di *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*; sono tutte infezioni che si diffondono da una persona all'altra attraverso la puntura delle zanzare femmina del genere *Anopheles* (2). Esistono circa 400 diverse specie di

Corrispondenza a: Roberta Rolla, S.C.D.U. Laboratorio di Biochimica Clinica, AOU "Maggiore della Carità", Corso Mazzini 18, 28100 Novara. Tel. 03213733542; E-mail roberta.rolla@med.uniupo.it

Ricevuto: 01.02.2018

Revisionato: 13.06.2018

Accettato: 26.06.2018

Pubblicato on-line: 17.07.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.040

zanzare *Anopheles*, ma solo 30 sono responsabili della trasmissione della malaria umana e sono quindi le specie che rivestono grande importanza nei progetti di eradicazione e controllo della malaria in regioni endemiche (2). Il *P. falciparum* è la specie responsabile di ~50% dei casi di malaria e presenta maggiore morbosità e mortalità. Nelle zone endemiche non sono rare infezioni miste, con contemporanea presenza di plasmodi di tipi diversi (1).

Negli ultimi anni sono stati registrati casi di malaria umana dovuti al *P. knowlesi*, una specie che causa la malaria nei primati ed è localizzata in alcune aree forestali del Sud-Est asiatico (Tabella 1). Si tratta di una zoonosi, il cui ospite principale è la scimmia *Macaca fascicularis*, che causa infezioni di difficile diagnosi nell'uomo (3). La prima evidenza di *P. knowlesi* trasmesso ad un essere umano fu riportata solo nel 1965 (3). I dati molecolari, entomologici ed epidemiologici indicano tuttavia che le infezioni umane con *P. knowlesi* non sono di recente emersione. Infatti, le infezioni umane non sono state diagnosticate fino a quando non sono stati disponibili metodi di rilevazione molecolare in grado di distinguere il *P. knowlesi* dal *P. malariae* morfologicamente molto simili (4).

La diffusione della malaria nel mondo si è notevolmente ridotta grazie all'attuazione di programmi di lotta e controllo promossi dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS); nel mese di aprile 2016 l'Ufficio Regionale Europeo dell'OMS ha comunicato l'eradicazione della trasmissione di malaria autoctona sul territorio dei Paesi Europei (5). Tuttavia, nelle aree tropicali e sub tropicali la malaria rappresenta ancora la più importante malattia trasmessa da vettore. Nell'ultimo rapporto sulla situazione mondiale della malaria, pubblicato dall'OMS (2017), sono riportati 95 paesi con endemia malarica, circa 216 milioni di casi e 445 mila decessi (1).

L'infezione malarica, endemica nei paesi in via di sviluppo, per effetto degli scambi sempre più frequenti di tipo commerciale, turistico, umanitario, sta progressivamente interessando anche Paesi come l'Italia, come malattia da importazione. Inoltre, vengono riportati sempre più frequentemente casi di plasmodi resistenti ai farmaci convenzionali notoriamente efficaci (1,6).

In Italia la malaria è diventata la malattia tropicale più frequentemente importata. I dati epidemiologici relativi al

periodo 2011-2015 mostrano 3.633 casi di malaria notificati, 89% dei quali con diagnosi confermata. Si tratta per la quasi totalità di casi d'importazione, ad eccezione di sette casi autoctoni: due indotti (*P. falciparum* e *P. malariae*), tre criptici (uno di *P. falciparum* e due di *P. malariae*), uno sospetto da bagaglio (*P. falciparum*), uno sospetto introdotto (*P. vivax*) (6). Nel 70% dei casi si è trattato di maschi, il 45% dei quali nella fascia di età 24-44 anni. L'80% dei casi è stato riscontrato in stranieri: nella grande maggioranza dei casi si trattava di immigrati regolarmente residenti in Italia e rientrati nel nostro Paese dopo visite temporanee nel paese di origine; in pochi casi si trattava invece di immigrati al primo ingresso. Il rimanente 20% dei casi è stato riscontrato in cittadini italiani rientrati da viaggi in Paesi endemiche: il 41% per lavoro, il 22% per turismo, il 21% per volontariato/missione religiosa (6). La classificazione dei casi di malaria in Paesi non endemici è riportata in Tabella 2.

La specie di plasmodio predominante è risultata *P. falciparum*, con l'82% dei casi segnalati, seguita da *P. vivax* (12%), *P. ovale* (4%), *P. malariae* (2%); rare le infezioni miste (0,4%) (5). La maggior parte dei casi di malaria sono stati notificati nelle regioni del centro-nord, in particolare il 32% in Lombardia, il 16,8% in Veneto, il 15,3% in Emilia-Romagna e l'11% in Piemonte (6).

Nel caso di sospetto clinico di infezione malarica, il metodo di riferimento per la diagnosi e la determinazione dell'indice di parassitemia è la ricerca ed il conteggio del parassita su striscio di sangue periferico, a goccia spessa e sottile previa opportuna colorazione. Sono disponibili, tuttavia, test rapidi come ad esempio quelli immunologici o molecolari per la ricerca degli acidi nucleici del parassita, che rappresentano un utile sussidio alla diagnosi (1).

La bassa incidenza di nuove diagnosi nei paesi industrializzati, nonostante la disponibilità di programmi di VEQ mirati, non permette di mantenere negli operatori un livello di competenza adeguato per il riconoscimento della malaria all'osservazione microscopica dei preparati, specialmente nei laboratori di ospedali non specializzati. Per questo motivo, al fine di garantire una diagnosi precoce e corretta dell'infezione, può essere importante l'impiego di metodi diagnostici alternativi alla diagnostica al microscopio (1).

Gli analizzatori ematologici possono rappresentare un valido aiuto per sollevare un sospetto di malaria

**Tabella 1**

*Specie di Plasmodium e loro diffusione nel mondo*

Parassita	Aree Geografiche	Incidenza
<i>Plasmodium falciparum</i>	Regioni tropicali	49%
<i>Plasmodium vivax</i>	Zone climatiche temperate	43%
<i>Plasmodium malariae</i>	Africa	7%
<i>Plasmodium ovale</i>	Africa occidentale	1%
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Sud-est asiatico	non disponibile

**Tabella 2**

Classificazione dei casi di malaria in Paesi non endemici; la terminologia è quella indicata dalla Organizzazione Mondiale della Sanità

Caso importato	Caso di malaria contratta dopo soggiorno in zona endemica con manifestazione clinica successivamente al rientro in Italia.
Caso autoctono	Caso di malaria contratta con certezza sul territorio nazionale. <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>indotto</b>: attraverso mezzi artificiali (trasfusioni, trapianti);</li> <li>• <b>introdotto</b>: attraverso sospetta trasmissione da parte di zanzare indigene verosimilmente infettatesi su un caso d'importazione;</li> <li>• <b>criptico</b>: caso isolato di malaria per il quale le indagini epidemiologiche non siano riuscite ad identificare con certezza la fonte d'infezione o a ipotizzarne ragionevolmente una (malaria da bagaglio, malaria d'aeroporto).</li> </ul>
Recidiva	Manifestazione secondaria di un'infezione malarica da <i>P. vivax</i> o <i>P. ovale</i> che si verifica a distanza variabile (settimane, mesi, anni) dall'attacco primario e originata da forme epatiche quiescenti del parassita (ipnozoiti).
Recrudescenza	Nuova manifestazione di un'infezione malarica a causa di forme ematiche del parassita, dovuta a: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. malariae</i> se si verifica a lunga distanza (anche molti anni) da un attacco primario a cui sia riconducibile;</li> <li>• diagnosi errata o a resistenza al farmaco utilizzato per la terapia se si verifica a breve distanza dall'attacco primario (giorni o settimane).</li> </ul>

anche e soprattutto quando l'infezione non è attesa, dal momento che se esiste il sospetto clinico, l'iter diagnostico è quello poc'anzi descritto.

Scopo della presente rassegna è quello di mettere in evidenza l'utilità dell'esame emocromocitometrico nell'iter diagnostico dei soggetti affetti da malaria, prendendo in considerazione gli analizzatori emocromocitometrici automatici più comunemente utilizzati nei laboratori italiani. Viene anche brevemente descritto il percorso diagnostico standard e i metodi alternativi disponibili.

## L'ESAME EMOCROMOCITOMETRICO NELLA DIAGNOSI DELLA MALARIA

L'esame emocromocitometrico è uno degli esami più frequentemente richiesti e normalmente è disponibile in tutti i laboratori, 24 ore al giorno. È un esame che, indipendentemente dalla tecnologia adottata dall'emocitometro, fornisce informazioni sia quantitative che qualitative sulle popolazioni cellulari presenti nel sangue periferico. Gli emocitometri, per le loro modalità di funzionamento, possono potenzialmente rilevare anche le alterazioni indotte nelle cellule dall'infezione malarica. Per queste ragioni, l'esame emocromocitometrico può essere un utile ausilio nella diagnosi/screening dell'infezione malarica in combinazione agli altri esami di laboratorio più specificatamente deputati all'identificazione del parassita malarico che sono elencati nel paragrafo dedicato al Percorso diagnostico di laboratorio, ed essere di grande utilità per segnalare la possibile infezione anche in assenza di sospetto clinico. Per svariate ragioni, gli esami specifici per la diagnosi di malaria non sono disponibili in tutti i laboratori e alcuni presentano diverse limitazioni, tanto che i laboratoristi e l'industria hanno investito importanti risorse per la

ricerca di metodi alternativi (7, 8-32); l'esame emocromocitometrico assume quindi un'importanza rilevante.

La principale fonte nutritiva del parassita malarico è rappresentata dall'emoglobina. Il plasmodio idrolizza l'emoglobina tramite l'eme polimerasi che neutralizza il gruppo eme potenzialmente tossico, polimerizzandolo in un composto insolubile, formando cristalli di emozoina o pigmento malarico. L'emozoina è un pigmento ferro-porfirinico che si accumula nel citoplasma dei parassiti sotto forma di granuli. Diversi farmaci antimalarici puntano ad inibire la biocristallizzazione dell'emozoina. Il pigmento malarico emozoina e le emazie parassitate polarizzano la luce in modo diverso rispetto alle emazie non parassitate fornendo segnali alterati rispetto alle normali caratteristiche cellulari; queste alterazioni possono essere rilevate dagli analizzatori ematologici di ultima generazione, permettendo così la progettazione di algoritmi diagnostici per la creazione di un allarme di sospetto malaria e/o di emazie parassitate (7, 8-11).

Nei prossimi paragrafi sono descritte le modalità con le quali i diversi emocitometri automatici comunemente utilizzati pongono il sospetto di infezione malarica.

## ABX Pentra DX Nexus

Gli analizzatori ABX Pentra DX Nexus (ABX-Horiba, Montpellier, France), adottano per i conteggi cellulari, un metodo ottico combinato alla citochimica, a sistemi di lisi selettiva ed al metodo impedenziometrico. La presenza del parassita malarico genera nella curva di distribuzione delle emazie e delle piastrine alterazioni aspecifiche ma costanti. Inoltre, possono comparire alterazioni nella zona del rumore di fondo nel citogramma della conta leucocitaria differenziale (LMNE), dovute alla presenza stessa del parassita che va ad occupare la regione a sinistra dei linfociti.

### Alterazioni dei citogrammi

**Conta leucocitaria differenziale.** All'osservazione del citogramma LMNE (Figura 1A), (canale di conta con principio di misura citochimico Sudan Black, combinato all'impedenziometria), si evidenzia abbastanza distintamente la presenza di quattro popolazioni cellulari in funzione di volume (asse delle ascisse) e di assorbanza (asse delle ordinate). Di queste, la prima si posiziona interamente nell'area identificata come Left Lympho, che corrisponde a cellule di piccole dimensioni o ad altri interferenti, come agglutinati piastrinici ed eritroblasti, con colorazione citochimica negativa (Figura 1A, area rossa); a seguire si posiziona una seconda popolazione cellulare (Figura 1A, area blu), e adiacente una terza popolazione cellulare, posizionata nella zona centrale dell'area dei linfociti fino all'area dei linfociti attivati o atipici (Figura 1A, area verde). Infine, situata nella zona dei monociti, si posiziona la quarta popolazione (Figura 1A, area viola), che presenta un aspetto più disperso, con rari segnali nella zona dei monociti immaturi. Si veda per confronto un citogramma normale in [Figura 1S](#).

Nel referto strumentale (Figura 1A) è chiara la natura delle popolazioni riconosciute nella matrice: le prime due (area rossa e blu) sono ascrivibili ai differenti stadi maturativi dei parassiti intra-eritrocitari (trofozoi e schizonti rispettivamente); la terza ai linfociti, presenti anche in forma attivata (area verde); la quarta ai monociti (area viola), spesso presenti in forma reattiva nelle parassitosi.

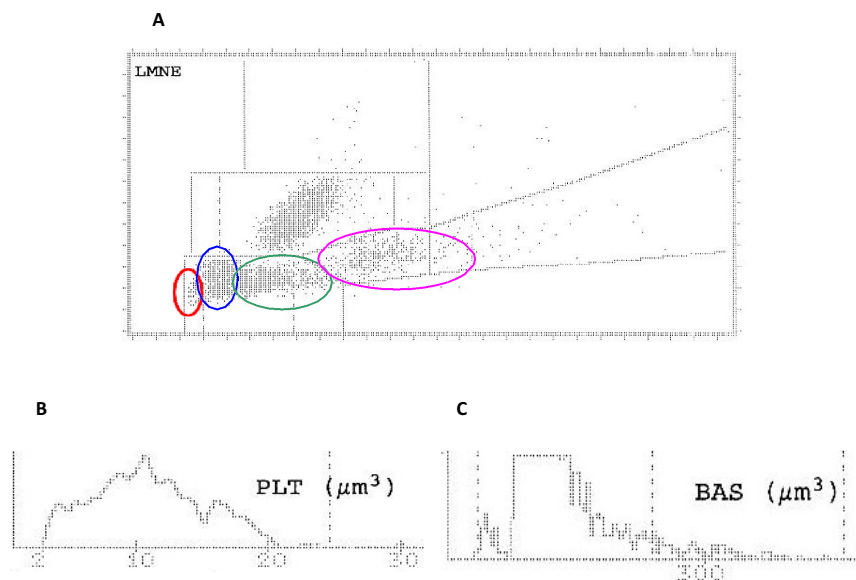
**Citogrammi delle piastrine e dei basofili.** Le curve di distribuzione delle piastrine (Figura 1B) e dei basofili (Figura 1C) appaiono irregolari. Si veda per confronto la [Figura 1S](#). In particolare la curva di distribuzione del volume piastrinico presenta un aumento della dispersione dei valori; la curva di distribuzione dei basofili evidenzia invece un primo picco, di piccola dimensione e posizionato al primo discriminante, ascrivibile ai parassiti, mentre il picco di pseudo-basofilia è attribuibile ai linfociti attivati resistenti alla lisi.

**Conteggio reticolocitario.** Per quanto riguarda la determinazione dei reticolociti effettuata in fluorescenza, può verificarsi una interferenza nel conteggio con aumento spurio delle concentrazioni, che può risultare a carico di tutte le frazioni reticolocitarie, in modo non costante e non uguale, quale indicatore della possibile presenza di acido nucleico del parassita.

### ADVIA 2120i

Anche nei citometri a flusso ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics USA), che adottano per i conteggi cellulari un metodo ottico in combinazione con la citochimica e sistemi di lisi selettiva, la presenza del parassita malarico nel sangue periferico determina specifiche anomalie quantitative e qualitative del conteggio piastrinico e della conta leucocitaria differenziale (18, 19).

L'ematologo olandese Jan van den Boogaart e il biochimico austriaco Oliver Hayden, sfruttando la rilevazione di queste alterazioni, hanno sviluppato e



**Figura 1**

ABX Pentra DX Nexus. Alterazioni dei citogrammi della conta leucocitaria differenziale, delle piastrine e dei basofili in caso di malaria. A) Citogramma della conta leucocitaria differenziale (LMNE), con suddivisione delle popolazioni cellulari come di seguito indicati. Area rossa, popolazione dei linfociti con deviazione a sinistra; area blu, popolazione dei linfociti normali; area verde, popolazione dei linfociti attivati/atipici; area viola, popolazione dei monociti immaturi.

B) Grafico di distribuzione delle piastrine (PLT) con evidenti irregolarità.

C) Grafico di distribuzione dei basofili (BAS) con evidenti irregolarità.

brevettato un allarme morfologico per evidenziare la presenza di parassiti malarici nel sangue periferico. L'algoritmo che genera l'allarme morfologico è stato elaborato sia grazie a parametri standard dell'esame emocromocitometrico (come ad esempio il conteggio delle piastrine, il valore dell'emoglobina), che a parametri specifici tecnologia-dipendenti. Questi ricercatori, utilizzando il metodo statistico denominato "linear discriminant analysis" (LDA), hanno stabilito i valori medi di 500 parametri forniti da ADVIA 2120i, sia in pazienti positivi che negativi per malaria. Questo metodo ha evidenziato che i 7 parametri elencati in Tabella 3 sono significativamente alterati in caso di malaria. L'allarme brevettato ha una sensibilità di 97,5% ed una specificità di 98,6% (19).

#### Alterazioni dei citogrammi

Oltre all'allarme sopra descritto, che è basato su parametri numerici, nel caso di infezione malarica sono visibili anche variazioni sui citogrammi dei canali Baso e Perox (Figura 2). I citogrammi normali di confronto sono presentati in Figura 2S.

**Canale Perox.** In questo citogramma, le emazie parassitate generano una popolazione cellulare di

medie-grandi dimensioni mieloperossidasi-negativa, che si colloca nell'area delle grandi cellule non colorate (Large Unstained Cells; LUC) (Figura 2A, zona colorata in azzurro chiaro). Quando la popolazione delle LUC supera il 4,5%, lo strumento genera l'allarme Linfociti atipici (ATIP), frequentemente descritto in caso di infezione malarica. Un aumento delle LUC, in cui la popolazione cellulare presenta una tipica distribuzione spaziale detta a fiamma, è indicativo della possibile presenza di popolazione eritrocitaria parassitata (Figura 2A).

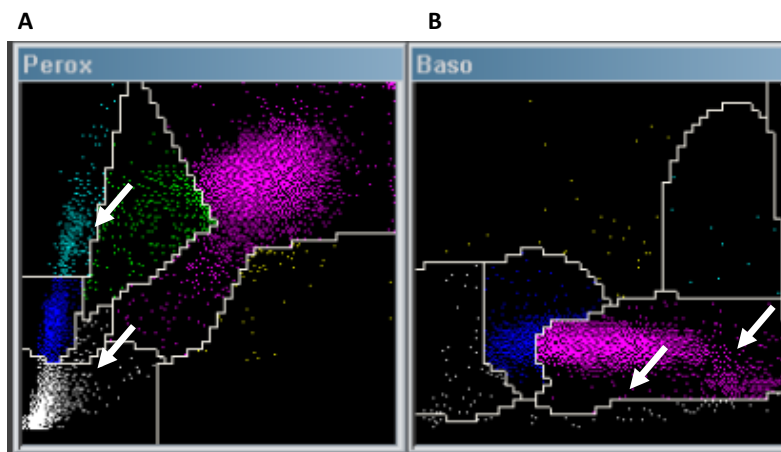
**Canale Baso.** In corso di infezione da Plasmodio, i neutrofilii e gli eosinofili, come meccanismo di difesa, perdono enzimi proteolitici, con conseguente riduzione sia di densità che di volume cellulare. Il citogramma risulta così modificato come mostrato in Figura 2B. Il parametro numerico osservato (riduzione densità/volume) è stato incluso nell'algoritmo sopra descritto per la costruzione di un allarme morfologico di sospetta infezione malarica.

**Altre alterazioni.** In corso di malaria è spesso presente piastrinopenia. Inoltre, l'area del citogramma Perox degli agglutinati piastrinici risulta affollata da numerosi eventi, che generano un allarme morfologico di

**Tabella 3**

Descrizione dei parametri inclusi nel brevetto dell'algoritmo predittivo diagnostico per infezione malarica di ADVIA 2120i (19).

Parametri	Descrizione	Rilevazione
Descrizione	Densità di distribuzione dei polimorfonucleati	Alterazione del volume e della complessità cellulare dei leucociti a seguito di fagocitosi dei parassiti e/o dei granuli di emozina
MPC	Densità di distribuzione delle piastrine	Alterazione morfologia piastrinica a seguito di infezione malarica
PLT	Conteggio delle piastrine	Piastrinopenia a seguito di infezione malarica
PLT mode	Valori di impostazione del dispositivo di ADVIA 2120i che corrispondono ai valori medi di piastrine x (PLTx) e y (PLT y)	Alterazione morfologia piastrinica a seguito di infezione malarica
% Baso Noise	Porzione non specifica del diagramma di luce diffusa dopo una lisi specifica mediante reagente BASO	
% Abnorm	Deviazione standard della distribuzione delle popolazioni leucocitarie	Alterazione morfologia cellulare a seguito di infezione malarica
Perox Y Sigma	Grado di dispersione del volume cellulare dei neutrofilii a seguito della colorazione citochimica con perossidasi	Alterazione morfologia cellulare a seguito di infezione malarica

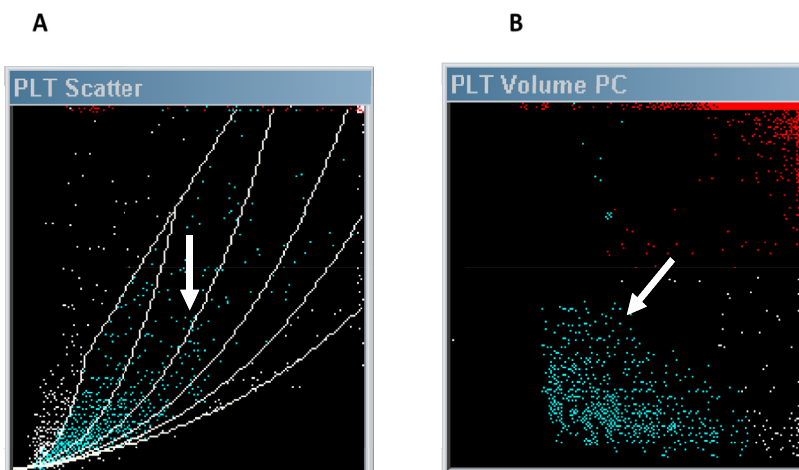


**Figura 2**

ADVIA 2120i. Alterazioni dei citogrammi della conta leucocitaria differenziale e del conteggio leucocitario in un caso di *P. falciparum* in forma gametocitica.

A) Citogramma della conta differenziale leucocitaria "Perox": in presenza di *P. falciparum*, è evidente la popolazione cellulare delle Large Unstained Cells (area azzurro chiaro, freccia superiore) e un cluster (area bianca, freccia inferiore) anomalo nell'area degli agglutinati piastrinici; le altre popolazioni cellulari: linfociti (area blu), monociti (area verde) e neutrofili (area rosa) non mostrano particolari anomalie.

B) Citogramma del conteggio leucocitario "Baso": la coda dei leucociti polimorfonucleati (area rosa) è in una posizione anomala, spostata verso l'asse delle ascisse (indicata dalle frecce) causata dalla alterazione dei leucociti in seguito alla fagocitosi dei parassiti.



**Figura 3**

ADVIA 2120i. Citogrammi piastrinici di un campione infettato da Plasmodio: si osserva una diversa distribuzione dei volumi e della densità dei trombociti in corso di infezione malarica. Tali alterazioni sono indicate dalle frecce.

aggregati piastrinici che non viene peraltro confermato alla revisione microscopica. L'allarme potrebbe essere prodotto dalla presenza nel sangue del plasmodio libero e/o dalle emazie parassitate. Sempre con riferimento alle piastrine, Advia 2120i grazie alla tecnologia ottica bidimensionale, mostra una densità di distribuzione modificata come si evince dalla Figura 3A e 3B: l'attivazione piastrinica, a seguito dell'infezione malarica, incide sia sulla granulosità che sull'ampiezza di distribuzione della popolazione piastrinica, che risulta aumentata e che viene segnalata dalla variabilità ottica

dell'aspetto delle particelle lette in questo canale di analisi, rispetto ai citogrammi normali che sono riportati a confronto (Figura 3SA, 3SB). Per le piastrine, due parametri di ricerca, MPC (indicatore del grado di granulosità piastrinico) e PMDW (ampiezza di distribuzione delle piastrine) sono stati inseriti nell'algoritmo ideato dai due ricercatori precedentemente menzionati.

Combinando, quindi, informazioni numeriche derivanti da parametri classici dell'esame emocromocitometrico e da parametri metodo-tecnologia

dipendenti elencati in Tabella 3, con le caratteristiche alterazioni dei citogrammi Perox e Baso sopra descritte (LUC e Aggregati piastrinici) è possibile sospettare la presenza di malaria semplicemente eseguendo un esame emocromocitometrico con questo specifico analizzatore.

L'allarme malaria, a seguito del brevetto, sarà a breve disponibile in tutti gli strumenti ADVIA 2120i.

### BC-6800

L'emocitometro BC-6800 di Mindray (Shenzhen Mindray Biomedical Electronics Co. Ltd., Cina), utilizza una combinazione di citometria a flusso in fluorescenza e sistemi di lisi selettiva per la conta leucocitaria differenziale, degli eritroblasti e l'identificazione di cellule anormali; il metodo impedenziometrico con focalizzazione idrodinamica è impiegato per il conteggio delle emazie e delle piastrine. BC-6800, oltre a fornire i parametri classici dell'esame emocromocitometrico e di approfondimento specifici tecnologia-dipendenti, presenta anche un allarme dedicato alle emazie parassitate denominato "Red Blood Cell" (RBC) infect? ed il parametro "InR #", utilizzabile solamente per ora a scopo di ricerca. Quest'ultimo parametro indica approssimativamente il numero di emazie parassitate in caso di malaria (21, 22). BC-6800 è stato il primo emocitometro commercializzato a disporre di allarmi qualitativi e quantitativi specifici per le emazie parassitate.

In un gruppo di 935 soggetti in cui 39 erano positivi per infezione con *P. vivax*, l'allarme "RBC infect?" ha mostrato una sensibilità di 92,3% ed una specificità del 100%, mentre in una popolazione di 948 soggetti di cui 39 positivi per *P. vivax* e 13 per *P. falciparum*, l'allarme ha mostrato una sensibilità di 78,9% ed una specificità del 100% (21,22).

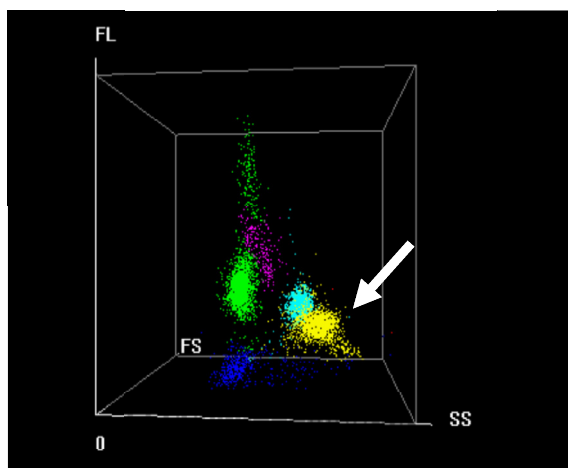
### Alterazioni dei citogrammi

**Conta leucocitaria differenziale.** In questo citogramma viene rappresentata la misura dell'intensità di fluorescenza sull'asse delle ordinate (direttamente proporzionale al contenuto di acidi nucleici cellulari) e la complessità cellulare sull'asse delle ascisse. Nei casi d'infezione malarica, in particolare con gametociti e schizonti circolanti, è evidente la presenza di una popolazione cellulare anomala aggiuntiva, costituita dalle emazie parassitate, oltre alle normali popolazioni cellulari attese. Queste generano una popolazione di media complessità e d'intensità di fluorescenza inferiore a quella tipica per i neutrofili, come evidente nella Figura 4 (area colore giallo). Al momento, in letteratura non sono disponibili dati e/o sono state descritte altre anomalie nel citogramma della conta leucocitaria differenziale ascrivibili alla presenza del parassita. Un citogramma normale è presentato in [Figura 4S](#), per il necessario confronto.

**Conta dei reticolociti.** La determinazione dei reticolociti su BC-6800 si basa sull'uso di un colorante polimetinico che si lega agli acidi nucleici presenti e quindi genera segnali proporzionali al contenuto di acido nucleico nelle emazie. Questo emocitometro, nel canale di conta dei reticolociti, dovrebbe quindi potenzialmente essere in grado di rilevare le emazie parassitate a causa del differente contenuto di acidi nucleici, ma al momento non sono disponibili dati su questo parametro.

### CELL DYN Sapphire e Ruby

Nei sistemi CELL DYN Sapphire e Ruby (Abbott, SC, USA), la determinazione del conteggio leucocitario è basata sulla tecnologia denominata "Multi Angle Polarized Scatter Separation". Questi sistemi analitici effettuano il conteggio cellulare utilizzando il metodo impedenziometrico e classificano i leucociti grazie alla



**Figura 4**

BC-6800. Alterazione del citogramma della conta leucocitaria differenziale. Si osserva una popolazione cellulare anomala gialla indicata dalla freccia, tipica dell'infezione da *P. vivax* con forme gametocitiche e di schizonte.

misurazione della diffusione di luce laser a tre diversi angoli ( $0^\circ$  proporzionale alla grandezza,  $10^\circ$  proporzionale alla struttura,  $90^\circ$  proporzionale alla granulosità); gli eosinofili sono classificati separatamente grazie alla specifica proprietà delle loro granulazioni di depolarizzare la luce polarizzata a  $90^\circ$ .

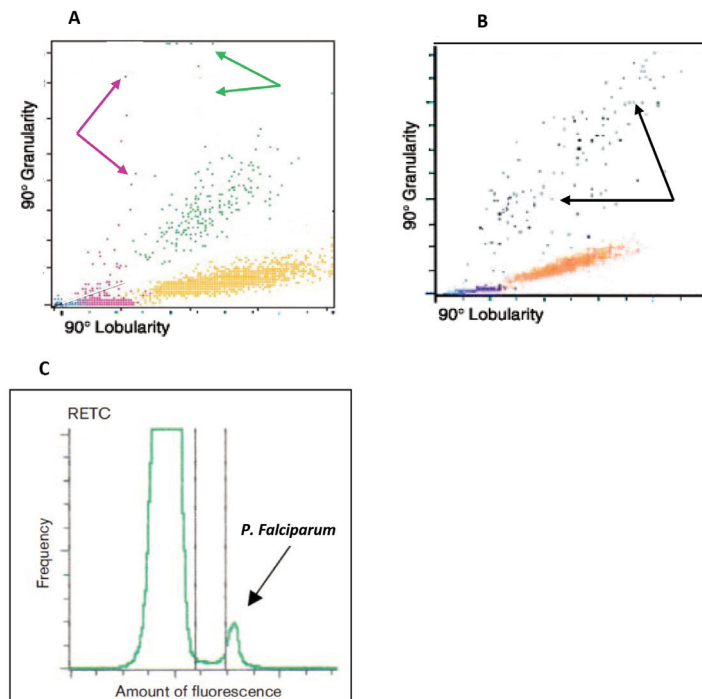
#### Alterazioni dei citogrammi

In questi sistemi la presenza del parassita malarico nel sangue periferico determina specifiche anomalie di distribuzione delle popolazioni cellulari, in particolare nel canale della conta leucocitaria differenziale e dei reticolociti.

**Conta leucocitaria differenziale.** I campioni in cui sono presenti i parassiti della malaria contengono cellule che, analogamente agli eosinofili, sono in grado di depolarizzare la luce polarizzata: sono monociti e neutrofilo che fagocitano le emazie parassitate e l'emozoina (23, 33). La presenza di cellule diverse dagli eosinofili, ma in grado ugualmente di depolarizzare la luce, è evidenziata nel citogramma in cui nell'asse delle ascisse è riportata la luce riflessa a  $90^\circ$  ("side scatter") e nell'asse delle ordinate la luce depolarizzata a  $90^\circ$ . Questi citogrammi sono generalmente indicati come lobularità/granularità ("lobularity/granularity scatter-plot") nella serie strumentale CD 3000 e come NEU-EOS nel

CD 4000 e nel Sapphire.

Le cellule incorporanti l'emozoina, compaiono come eventi situati sopra la linea che separa gli eosinofili (punti verdi) dai neutrofilo (punti arancione), monociti (punti viola) e linfociti (punti azzurro) (Figura 5). La presenza di questi eventi è stata utilizzata come indicatore della possibile presenza del parassita della malaria (23, 25). Il citogramma normale di confronto si trova in [Figura 5S](#). Tali eventi possono essere rappresentati in colore viola se tali cellule sono classificate come monociti, in colore verde se si tratta di granulociti erroneamente classificati come eosinofili o in colore azzurro se si tratta di linfociti anomali (i linfociti non hanno capacità fagocitaria) o di un sottotipo di monociti più piccoli, con nucleo rotondo erroneamente classificati dallo strumento come linfociti (Figura 5). In alcuni casi d'infezione da *P. vivax* compaiono degli eventi di colore rosso; si tratta di emazie parassitate resistenti alla lisi e correttamente classificate come tali dagli strumenti della serie CD 3500 (26). Nella serie CD 4000, sempre nel caso di infezione da *P. vivax* possono comparire degli eventi di colore nero che stanno ad indicare eventi non dovuti a cellule leucocitarie. Non è chiaro se questi eventi siano dovuti a emazie parassitate resistenti alla lisi o a forme mature del parassita (trofoziti e schizonti); questa ultima ipotesi spiegherebbe la maggior frequenza di questi eventi che



**Figura 5**

*Cell Dyn Sapphire. Alterazioni dei citogrammi della lobularità e dell'istogramma dei reticolociti in caso malaria.*

*A/B) Citogramma della lobularità: nel citogramma di sinistra*

*A) sono visibili gli eventi viola (monociti che hanno fagocitato emozoina) e gli eventi verdi (granulociti con emozoina misclassificati come eosinofili), in presenza di *P. falciparum*. Nel citogramma di destra;*

*B) sono visibili gli eventi neri, emazie parassitate resistenti alla lisi o forme mature del parassita, in presenza di *P. vivax*;*

*C) Istogramma reticolocitario: presenza di picchi anomali (indicato dalla freccia), conseguenza delle grandi quantità di RNA presente nelle emazie infette.*

si osserva nell'infezione da *P. vivax*, dove sono presenti in circolo molte forme mature (27) (Figura 5A). Nei 13 studi considerati (7) CELL DYN mostra un'accuratezza diagnostica della rilevazione di leucociti contenenti emozoina caratterizzata da una sensibilità che varia dal 48,6% al 100% e una specificità che varia dal 25,3% al 100%.

**Conta dei reticolociti.** La determinazione dei reticolociti sui sistemi CELL DYN si basa sull'uso di un reagente in grado di legarsi selettivamente al RNA e quindi generare segnali proporzionali al contenuto di acido nucleico. La colorazione dell'RNA reticolocitario fornisce informazioni utili sul loro grado di maturazione, in quanto i reticolociti più immaturi hanno un maggiore contenuto di RNA e pertanto producono una maggiore intensità di fluorescenza. Nei pazienti con infezione malarica, di solito *P. falciparum*, sono state segnalate alterazioni associate alla determinazione dei reticolociti (7). Tali alterazioni consistono nella presenza di picchi anomali nell'istogramma reticolocitario, di pseudo reticolocitosi e di un aumento spurio della frazione di reticolociti altamente immaturi, conseguenza delle grandi quantità di RNA presente nelle emazie infettate (7, 34) (Figura 5C). Non essendo previsti algoritmi in grado di generare segnali di allarme, in questi analizzatori la rilevazione delle alterazioni indotte dal parassita malarico dipende dalla carica parassitemica e dall'attenta valutazione dei citogrammi da parte degli operatori.

### DxH800 e LH 750

La tecnologia Coulter (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) si compone di tre diversi sistemi di misura indipendenti applicati contemporaneamente sul canale di lettura: l'impedenziometria come indicatore delle dimensioni tridimensionali delle cellule; la conduttività in radiofrequenza come indicatore della complessità cellulare interna (grandezza e densità del nucleo, rapporto nucleo/citoplasma); la diffrazione di luce laser (scatter) come indicatore di granularità e lobularità cellulare, forma e struttura della membrana cellulare (20, 24).

Per ciascuna popolazione cellulare, oltre alla determinazione quantitativa, il sistema fornisce il valore medio (media) e l'eterogeneità (DS) delle misure di volume, conduttività e scatter. Questi dati sono noti come parametri morfo-funzionali (comunemente noti come "Cell Population Data"; CPD), e sono indici numerici della posizione e della dispersione delle diverse popolazioni leucocitarie. Anomalie di distribuzione nei citogrammi riflettono anomalie morfologiche delle popolazioni leucocitarie che inducono modificazioni nei rispettivi CPD.

L'analizzatore ematologico LH750 utilizza un'analisi a tre parametri con un unico scatter di luce laser; questa tecnologia fornisce 24 CPD relativi alle quattro principali popolazioni leucocitarie (7-8). L'analizzatore ematologico DxH800 utilizza un'analisi multiparametrica più estesa denominata "Automated Intelligent Morphology" con un modulo multitrasduttore composto

da una cella a flusso e un laser a diodi con sensori ottici multiangolo (5 scatter) integrato con tecnologie di digitalizzazione ed analisi del segnale (20, 24). I dati analogici derivati dalle sette misure simultanee per singolo evento cellulare vengono trasformati in informazioni digitali multiparametriche. I 56 CPD forniti da DxH800 permettono di evidenziare molteplici aspetti morfologici relativi ai leucociti che vengono analizzati allo stato nativo dopo lisi dei globuli rossi, grazie alla stabilizzazione del campione in ambiente a temperatura controllata con cinetica di reazione stabilizzata.

### Alterazioni dei citogrammi

In caso di malaria, l'esame emocromocitometrico presenta piastrinopenia più o meno marcata, alterazioni a carico dei monociti e dei linfociti con morfologia di tipo reattivo. I CPD permettono di quantificare i cambiamenti morfologici a carico dei leucociti e rappresentano un valido strumento per lo screening della malaria.

Altre indicazioni di infezione malarica sono fornite dal canale dedicato al conteggio degli eritroblasti denominato "nucleated red blood cells (nRBC)". Nel citogramma di questo canale di analisi normalmente è possibile rilevare la presenza degli eritroblasti, la componente leucocitaria e piastrinica, con segnalazione o meno della presenza di agglutinati piastrinici. In caso di infezione malarica il citogramma mostra anche una quarta popolazione cellulare ascrivibile alle emazie parassitate.

**Conta differenziale leucocitaria.** I CPD forniscono valide informazioni circa le anomalie cellulari. Essi sono disponibili su tutti i campioni della routine ematologica analizzati con profilo che include la determinazione della conta leucocitaria differenziale (CBC-Diff)

I CPD utilizzati da DxH800 per lo screening malarico sono (Tabella 4) (20, 24):

- la DS dei linfociti ("Standard Deviation of Lymphocyte Low Angle Light Scatter": SD-LALS-LY),
- l'anisocitosi dei linfociti ("Lymphocyte anisocytosis" SD-V-LY),
- il volume medio di monociti ("Mean Monocyte Volume": MN-V-MO),
- l'anisocitosi dei monociti ("Monocyte anisocytosis": SD-V-MO),
- il fattore malarico ("Malaria Factor" = [SD Volume of Lymphocytes × SD Volume of Monocytes]/100)

I valori di sensibilità e di specificità dei parametri menzionati sono presentati in Tabella 4. A differenza di DxH800, l'analizzatore LH 750 non fornisce il parametro "Standard Deviation of Lymphocyte Low Angle Light Scatter" (SD-LALS-LY).

A titolo di esempio riportiamo in Tabella 4 i valori dei CPD in un campione con bassa parassitemia da *P. vivax*. I parametri CPD per lo screening di malaria, sono risultati tutti positivi in quanto superiori ai rispettivi valori decisionali.

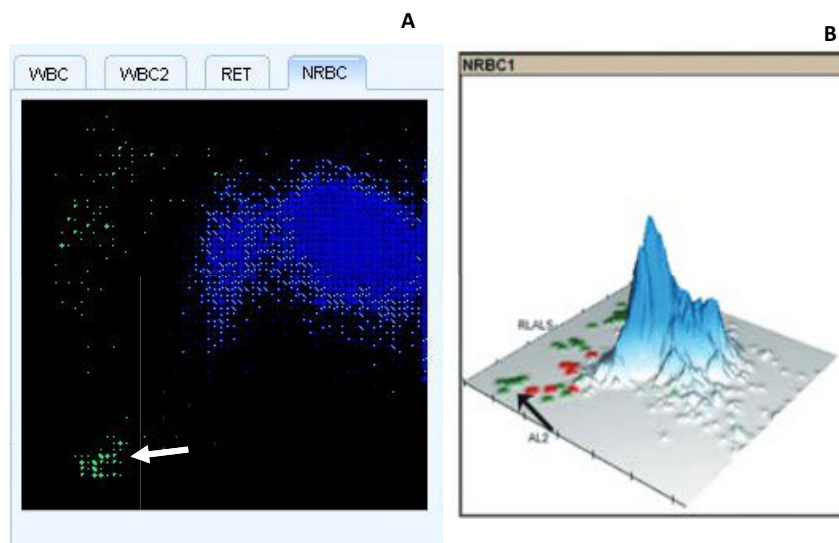
**Conteggio degli eritroblasti (canale nRBC).** A livello grafico, DxH800 mostra su questi citogrammi una tipica anomalia riconducibile alla presenza del plasmodio

**Tabella 4**

Valori di sensibilità, specificità dei vari parametri dello strumento DxH800 nello screening malarico. L'ultima colonna riporta, a titolo di esempio, i valori dei parametri strumentali riscontrati in un campione con bassa parassitemia da *P.vivax*: tutti i parametri risultano superiori al valore soglia.

Parametro	AUC	Sensibilità	Specificità	Valore soglia	Valore riscontrato in un campione con parassitemia da <i>P.Vivax</i>
SD-LALS-LY	0,988	94%	97%	>14,59	15,65
SD-V-LY	0,975	97%	92%	>15,86	22,68
MN-V-MO	0,999	97%	100%	>176	211
SD-V-MO	1,000	100%	100%	>20,23	25,6
Malaria Factor	0,999	100%	98,5%	>3,15	5,68

SD-LALS-LY, Standard Deviation of Lymphocyte Low Angle Light Scatter; SD-V-LY, Standard Deviation Volume Lymphocyte; MN-V-MO, Mean Monocyte Volume; SD-V-MO, Standard Deviation Volume Monocyte. Il Malaria Factor è calcolato come segue: [(SD Volume of Lymphocytes × SD Volume of Monocytes)].

**Figura 6**

*DxH800*. Alterazioni del citogramma del conteggio degli eritroblasti (nRBC) in caso di infezione da *P. vivax*.

A) Il segnale di infezione malarica da *P.Vivax* (area verde chiara, evidenziata dalla freccia), presenta una specificità e una sensibilità stimata pari al 100%, senza necessità di reagenti addizionali né di procedure specifiche.

B) Visualizzazione tridimensionale del segnale di infezione da *P.vivax* (indicato dalla freccia) nel citogramma nRBC.

malarico, facilmente riconoscibile e illustrata nel dettaglio in Figura 6 (il citogramma normale si trova in Figura 6S). Per *P. vivax* questo segnale presenta specificità pari al 100% e sensibilità pari al 100%, senza necessità di reagenti addizionali né di procedure specifiche (20, 24). La dimensione delle anomalie riconducibili alla presenza del *P. vivax* sul citogramma nRBC [rotazione della luce angolare a livello basso (RLALS) *versus* luce assiale (AL2)] è molto ben correlata con il livello di parassitemia presente nel campione (20, 24). L'intensità di questo segnale risulta quindi tanto più forte quanto più elevata è la parassitemia del campione, si attenua con il trattamento antimalarico del paziente fino a scomparire in assenza di

segni di malaria (20, 24). L'aggregazione piastrinica, eventualmente presente nei campioni della routine ematologica, genera un segnale anomalo sul citogramma nRBC con valori di dispersione della luce laser più elevati rispetto al segnale di malaria. L'analizzatore DxH800 permette di distinguere le due tipologie di segnale sullo stesso diagramma nRBC. Il segnale di malaria non risulta interferito dalla contemporanea presenza di aggregazione piastrinica.

### Sistemi XN e serie XE-2100/XE-5000

I sistemi modulari XN e gli analizzatori ematologici XE-2100 e XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan) sono

citometri a flusso, che adottano per i conteggi cellulari un metodo ottico in fluorescenza (combinazione di citometria a flusso in fluorescenza e sistemi di lisi selettiva).

#### Alterazioni dei citogrammi

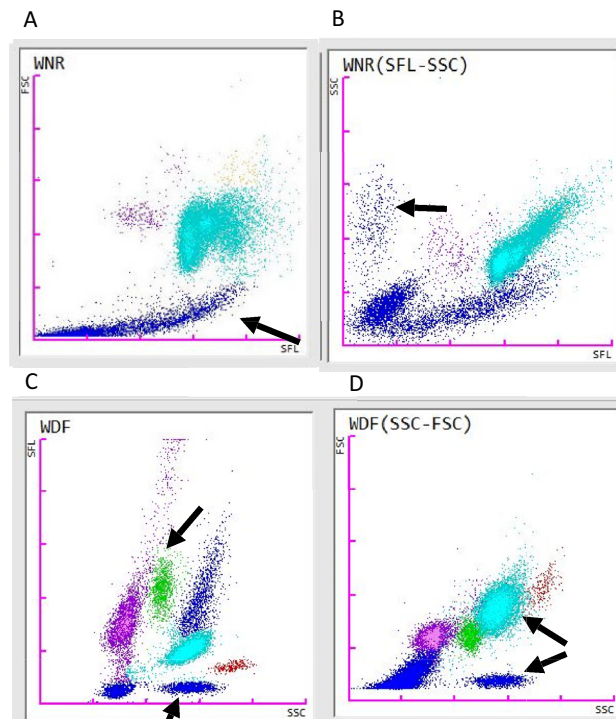
La presenza del parassita malarico nel sangue periferico determina specifiche anomalie di distribuzione delle popolazioni cellulari, in particolare nei citogrammi dei canali per il conteggio leucocitario ("White Nucleated Red Cell", WNR per il modulo XN con la possibilità di utilizzare due differenti proiezioni: WNR FSL\_FSC e WNR SFL\_SSC; e WBC/BASO per XE2100/500), nei canali per la conta differenziale leucocitaria ("White Cell Differential", WDF per il modulo XN con la possibilità di utilizzare due differenti proiezioni: WDF SSC\_SFL e WDF SSC\_FSC; WBC/DIFF per XE2100/5000) e quelli per la determinazione del conteggio e differenziazione dei reticolociti (RET) (15, 16).

**Conteggio leucocitario.** Modulo XN. Nei citogrammi del canale di analisi WNR: WNR e WNR FSL\_SFC si osservano alterazioni nella popolazione delle emazie

lisate e delle piastrine. In particolare, si osserva un aumento della fluorescenza (SFL) dovuto alla presenza degli acidi nucleici del parassita malarico (asse delle ascisse). Nel citogramma WNR SFL\_SSC tale anomalia risulta più evidente, con possibile sdoppiamento della popolazione delle emazie lungo l'asse delle ordinate ("Side Scatter": SSC), causato dall'aumentata complessità interna delle emazie lisate (Figura 7). I citogrammi normali sono presentati in [Figura 7S](#).

**XE 2100/5000.** Nel citogramma "WBC/BASO", si osservano alterazioni tipiche nella popolazione delle emazie lisate, in particolare possono essere evidenti degli eventi nell'area del citogramma a ridosso dell'asse delle ascisse che sono suggestivi di infezione di malaria (Figura 8) (30, 31, 34). Il citogramma normale è presente in [Figura 8S](#).

**Conta leucocitaria differenziale.** Modulo XN. Nel citogramma WDF le popolazioni cellulari di linfociti e/o monociti sono solitamente allungate lungo l'asse della fluorescenza (asse delle ordinate), per la presenza rispettivamente di elementi attivati e ad elevata attività fagocitaria (Figura 7). Tali alterazioni sono misurabili



**Figura 7**

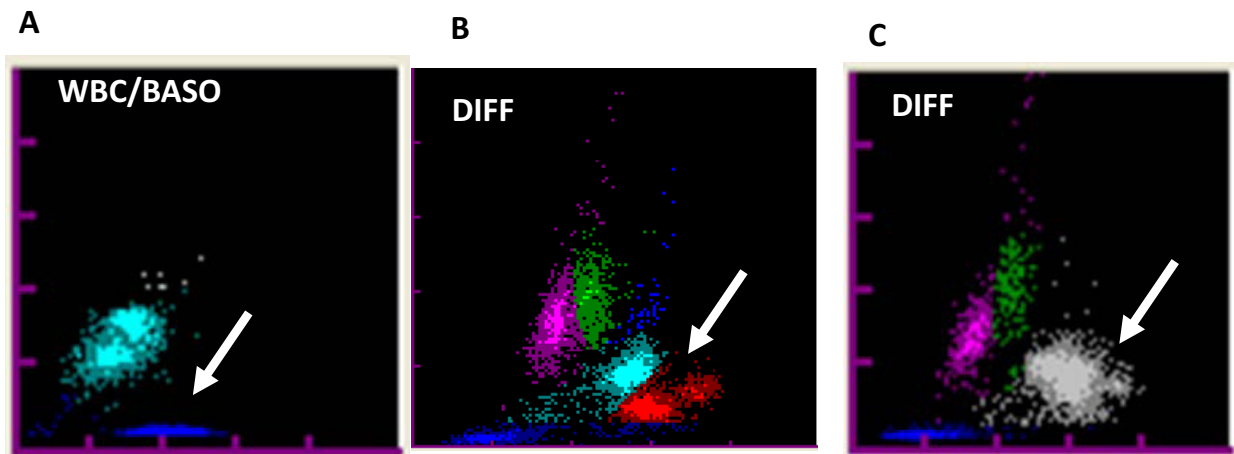
XN Modulo. Alterazioni dei citogrammi del conteggio leucocitario e della conta leucocitaria differenziale in caso di infezione da *Plasmodium spp* in forma gametocitica.

A) Citogramma conteggio leucocitario "WNR": si osserva un'alterazione nell'area blu all'origine degli assi (indicata dalla freccia), corrispondente alle emazie lisate, suggestiva di infezione malarica.

B) Citogramma conteggio leucocitario "WNR (SFL\_SSC)": si osserva un'alterazione nell'area blu (indicata dalla freccia), con suo sdoppiamento lungo l'asse y (SSC), dovuto all'aumento della complessità interna delle emazie parassitate.

C) Citogramma della conta leucocitaria differenziale "WDF": in presenza di gametociti di *Plasmodium spp*, la popolazione cellulare anomala (area blu) indicata con la freccia inferiore si trova sotto quella dei neutrofili (area azzurra). Le popolazioni cellulari dei linfociti (area rosa) e monociti (area verde) sono allungati lungo l'asse della fluorescenza (asse delle ordinate), per la presenza, rispettivamente, di elementi attivati (indicated dalla freccia superiore) e ad elevata attività fagocitaria.

D) Citogramma della conta leucocitaria differenziale "WDF (SSC\_FSC)": sempre in presenza di gametociti di *Plasmodium spp* si osserva uno sdoppiamento della popolazione cellulare dei neutrofili (area azzurra e area blu, indicate dalle due frecce) visibile lungo l'asse y (FSC).



**Figura 8**

*XE-2100. Alterazioni dei citogrammi del conteggio leucocitario e della conta leucocitaria in caso di malaria.*

*A) Citogramma del conteggio leucocitario "WBC/BASO" di un campione con infezione da *P. vivax*: si osservano alterazioni tipiche nella popolazione delle emazie lisate, in particolare possono essere evidenti degli eventi nell'area del citogramma a ridosso dell'asse delle ascisse, indicati con la freccia.*

*B) Citogramma della conta leucocitaria differenziale "DIFF", di campione con infezione da *P. vivax* con gametociti: in questo caso è evidente una popolazione cellulare anomala di eosinofili; la freccia indica lo sdoppiamento della popolazione.*

*C) Citogramma della conta leucocitaria differenziale "DIFF" di campione con infezione da *P. vivax*: è evidente un'interferenza fra la popolazione cellulare dei neutrofili e quella degli eosinofili tale che lo strumento non riesce ad assegnare il codice colore esatto alle due popolazioni cellulari, evidenziando la presenza di un solo cluster cellulare anomalo di colore grigio (indicato con la freccia).*

tramite i CPD. In particolare, combinando i CPD dei linfociti e dei monociti è stato possibile definire un algoritmo specifico per il sospetto di infezione malarica denominato XN-Malaria Factor (XN-MF), con una sensibilità del 0,93 ed una specificità del 0,81 alla soglia di  $\leq 4,4$  (17). Le anomalie più caratteristiche si osservano nella popolazione cellulare dei neutrofili lungo l'asse delle ascisse (Side Scatter: SSC, che misura la complessità cellulare) di citogramma WDF e risultano differenti a seconda del tipo di parassita malarico presente e del suo stadio maturativo del ciclo vitale (16, 17). In particolare, le alterazioni risultano molto più marcate in presenza di gametociti e schizonti di *P. vivax* o *P. ovale*; in questi casi si può osservare un vero e proprio sdoppiamento della popolazione dei neutrofili, dovuto alla presenza di molte forme maturative del parassita e di cristalli di emozoina nel sangue periferico. Tale sdoppiamento, visibile soprattutto nel citogramma WDF SSC\_FSC, talvolta può determinare una pseudo-eosinofilia (Figura 7). In presenza del *P. falciparum*, le anomalie nella popolazione cellulare dei neutrofili risultano più lievi. Questo differente comportamento è spiegabile con il ciclo vitale e la biologia del *P. falciparum*, nel quale sono molto meno frequenti nel sangue periferico i gametociti, gli schizonti, e i cristalli di emozoina. Nei casi di infezione da *P. falciparum* si può comunque osservare una popolazione cellulare anomala, al di sotto di quella dei neutrofili, quasi totalmente colorata in blu, che in alcuni casi può determinare pseudo-eosinofilia (Figura 7). Inoltre, in presenza di *P. vivax* e *P. ovale*, il conteggio dei leucociti nel canale WDF può essere sovrastimato (17). Tuttavia, dal confronto con i leucociti totali contati nel canale WNR, lo strumento evidenzia discrepanza significativa,

generando uno specifico allarme (Differenza tra canali WNR e WDF: verificare risultati). In presenza di *P. falciparum*, invece, l'interferenza nel canale WDF non determina significative sovrastime di conteggio leucocitario rispetto al canale WNR. Queste caratteristiche anomalie di distribuzione delle popolazioni cellulari sono state recentemente utilizzate al fine di implementare un allarme morfologico specifico per le emazie parassitate (pRBC). Questo allarme è disponibile nella versione software 00-21 del modulo XN. Lo strumento dotato di questo software identifica con un codice colore specifico la popolazione cellulare anomala nel citogramma WDF. Tutte le anomalie di misura nei canali WNR e WDF sopra descritte, combinate alle alterazioni dei parametri morfo-funzionali linfocitari (17) (solitamente attivati in risposta all'infezione) e al frequente riscontro di trombocitopenia e/o anemia, consentono un primo screening nell'iter diagnostico di sospetta infezione malarica.

XE2100/5000. Nel citogramma DIFF, in caso di infezione malarica sono stati osservati citogrammi anomali causati dalla birifrangenza dell'emozoina (30), che spesso mostrano una doppia popolazione cellulare dei neutrofili, anomalie nel posizionamento della popolazione cellulare dei neutrofili, doppia popolazione eosinofila, ed infine talvolta la presenza di una zona grigia in cui non sono differenziate le popolazioni cellulari di neutrofili/basofili ed eosinofili (28, 29). Queste anomalie sono illustrate in Figura 8 (citogramma normale in [Figura 8S](#)) e sono solitamente associate alla presenza del parassita in forma gametocitica o di schizonte (7, 29). In base ai dati della letteratura, la sensibilità di questi analizzatori nel rilevare le alterazioni varia da 68,9% a 74,2%, mentre la specificità varia dal

90,6% al 91,1% (7, 28, 29).

**Conteggio dei reticulociti.** Le alterazioni del citogramma RET sul modulo XN e su XE2100/5000 sono molto diverse a seconda del tipo di parassita malarico presente nel sangue, più evidenti in presenza di *P. falciparum*, sfumate o assenti in presenza di *P. vivax* o *P. ovale*. Questo differente comportamento è dovuto al fatto che *P. falciparum* infetta tutti gli eritrociti, sia quelli maturi che i reticulociti; la percentuale di eritrociti infettati con una maggiore concentrazione di acidi nucleici è dunque elevata, e vengono rilevati dallo strumento come reticulociti maturi e immaturi (29-31). *P. vivax* e *P. ovale* infettano invece prevalentemente le emazie giovani e i reticulociti (35). Pertanto, in presenza di *P. falciparum*, è frequente il riscontro di pseudo-reticulocitosi con significativa alterazione del citogramma RET, aumento di RET (% e/o numero assoluto), senza però contestuale aumento delle frazioni reticulocitarie più immature ("Medium Fluorescence Ratio", MFR; "High Fluorescence Ratio", HFR). Quasi sempre i risultati dell'analisi RET sono accompagnati da un allarme morfologico (RET Abn Scattergram). Tale tipo di anomalia non si verifica invece in presenza di *P. vivax* o *P. ovale*.

È stato osservato che nella maggior parte dei pazienti con parassitemia bassa ( $\leq 200$  parassiti/ $\mu\text{L}$ ), gli analizzatori non sono riusciti a produrre citogrammi anomali generando falsi negativi (31, 32).

## PERCORSO DIAGNOSTICO DI LABORATORIO

Il sospetto clinico di malaria va sempre confermato in laboratorio con la ricerca diretta dei parassiti in campioni di sangue periferico. La diagnosi microscopica rappresenta il metodo di elezione per la diagnosi di malaria e sebbene siano disponibili altri metodi diagnostici, questi devono affiancare e non sostituire l'esame microscopico.

### Esame microscopico

La ricerca del plasmodio con emoscopia diretta (goccia spessa e striscio sottile) rappresenta il gold standard per la diagnosi della malaria, come previsto dall'OMS (36-38). Sia lo striscio sottile che la goccia spessa devono essere preparati a partire da puntura capillare. Il sangue ottenuto da puntura del dito o del lobo dell'orecchio è il campione ideale perché la densità dei trofozoiti o degli schizonti è maggiore nel sangue di queste aree ricche di capillari (39). Il sangue ottenuto mediante venipuntura prelevato in provette con anticoagulante (K3 o K2EDTA) è accettabile se lo striscio viene preparato entro 12 ore dal prelievo per evitare alterazioni morfologiche nei plasmodi eventualmente presenti (40). Inoltre, è stato segnalato il possibile effetto dell'anticoagulante sulla morfologia dei gametociti, che potrebbe compromettere il corretto riconoscimento del parassita: i gametociti del *P. falciparum* possono ad esempio perdere la loro caratteristica morfologia, assumere una forma rotondeggiante, tanto da assomigliare ai gametociti del

*P. malariae* (41). Per la diagnosi definitiva di malaria dovrebbero essere allestiti almeno due strisci di sangue periferico goccia spessa e due strisci di sangue periferico sottili, il prima possibile dopo la raccolta, in quanto il ritardo nella preparazione degli strisci potrebbe provocare cambiamenti nella morfologia dei parassiti e nelle caratteristiche di colorazione (36-40).

### Allestimento e analisi microscopica della goccia spessa

La preparazione della goccia spessa prevede la deposizione su vetrino di 3-4  $\mu\text{L}$  di sangue da puntura capillare, che vengono successivamente miscelati e spianati su un'area di circa 2 cm di diametro. Ad operazione conclusa lo spessore ottimale del sangue dovrebbe essere tale da permettere di vederci attraverso; il preparato viene poi lasciato asciugare all'aria. La goccia spessa così allestita non deve essere fissata ma colorata direttamente per permettere la lisi delle emazie e meglio evidenziare i parassiti. Utilizzare la colorazione di Giemsa o May Grunwald Giemsa. I migliori risultati si ottengono utilizzando la soluzione di Giemsa diluita 1:30 (35, 42).

La goccia spessa di sangue viene utilizzata in quanto permette di esaminare una quantità di sangue molto maggiore rispetto allo striscio sottile (~20 volte), determinando un aumento della sensibilità del test, soprattutto in caso di bassa parassitemia. L'OMS raccomanda di osservare la goccia spessa inizialmente con un ingrandimento basso (obiettivo 10X o 20X) ai fini di una valutazione preliminare del campione; quindi di ri-esaminarla utilizzando la lente di un obiettivo a immersione 100X (1). È opportuno selezionare un'area ben colorata e ben popolata di leucociti (10-20 cellule/campo), in quanto per la diagnosi di malaria, l'OMS raccomanda di sottoporre a screening almeno 100 campi (obiettivo a immersione 100X), ciascuno contenente circa 20 leucociti, prima di refertare la goccia spessa come negativa (1). Supponendo una conta leucocitaria media di 8.000/ $\mu\text{L}$ , questa modalità operativa dà una soglia di sensibilità di 4 parassiti/ $\mu\text{L}$ . Nei pazienti immunodepressi, la malaria sintomatica può verificarsi a densità parassitarie inferiori e lo screening di più campi (ad esempio, 200-300) potrebbe essere giustificato, in funzione del contesto clinico, della presenza di personale adeguatamente formato e del tempo richiesto dalla valutazione (43).

### Allestimento e analisi microscopica dello striscio sottile di sangue periferico

Per l'identificazione morfologica del protozoo viene invece utilizzato lo striscio sottile, in quanto il riconoscimento della specie parassitaria risulta molto più difficoltoso sulla goccia spessa, a causa della rottura dei globuli rossi che si determina e alla conseguente perdita di vari elementi utili per la diagnosi di specie, come ad esempio le granulazioni intra-eritrocitarie (38). La preparazione dello striscio sottile prevede la deposizione di 1-2  $\mu\text{L}$  di sangue da puntura capillare ad un'estremità

di un vetrino accuratamente pulito e sgrassato. Si utilizza, poi, un secondo vetrino che viene strisciato sul primo in maniera tale che tutti gli eritrociti si dispongano a formare un singolo strato. A questo punto il vetrino viene asciugato all'aria, fissato con metanolo assoluto per 1 minuto (un tempo di fissazione superiore altera la visione di eventuali granulazioni eritrocitarie presenti) e colorato con la colorazione di Giemsa o May Grunwald Giemsa. I migliori risultati si ottengono utilizzando la soluzione di Giemsa diluita 1:10 (35, 39, 40,42,44).

Le linee guida internazionali raccomandano di osservare attentamente lo striscio, esaminando almeno 300 campi con l'obiettivo 100X in immersione (1, 43). In alcuni casi può essere clinicamente utile anche la quantificazione dei parassiti. In particolare, la valutazione della parassitemia è importante nelle infezioni di *P. falciparum* e *P. knowlesi* per stabilire la gravità dell'infezione e per verificare l'efficacia del trattamento. In tal caso, i parassiti della malaria possono essere quantificati confrontandoli numericamente agli eritrociti o ai leucociti (42, 43).

In particolare, per quantificare i parassiti della malaria versus gli eritrociti, le linee guida internazionali (43) raccomandano di contare le emazie parassitate tra 500-2.000 emazie presenti sullo striscio sottile ed esprimere i risultati come

$$\text{parassitemia \%} = (\text{emazie parassitate/emazie totali}) \times 100$$

Se la parassitemia è elevata (ad esempio >10%), ci si può limitare ad esaminare 500 emazie, se è bassa (ad esempio <1%), le emazie da esaminare salgono a 2.000.

Per quantificare i parassiti della malaria in rapporto ai leucociti, le stesse linee guida (43) raccomandano invece di esaminare lo striscio finché non si identificano 500 parassiti o 1.000 leucociti e di esprimere i risultati come parassiti per microlitro di sangue, usando il conteggio dei leucociti:

$$\text{Parassiti}/\mu\text{L} = (\text{parassiti/leucociti}) \times \text{numerosità dei leucociti}/\mu\text{L}$$

L'analisi morfologica dello striscio sottile di sangue, solo se colorato con colorazione Giemsa, consente inoltre di individuare anomalie morfologiche caratteristiche delle emazie parassitate e grazie a queste di differenziare le specie di *Plasmodium*. Le alterazioni morfologiche degli eritrociti infettati dalle diverse specie di *Plasmodium* sono illustrate in [Tabella 1S](#).

In particolare, in corso di infezione malarica si possono osservare nel citoplasma degli eritrociti caratteristiche granulazioni: se sono poche e grossolane si tratta delle granulazioni di Maurer, presenti nell'infezione da *P. falciparum*; se sono numerose ed uniformi si tratta invece delle granulazioni di Schüffner (piccoli granuli di colore rosso-rosa distribuiti generalmente in maniera uniforme su tutta la zona dell'eritrocita non occupata dal plasmodio), presenti nell'infezione da *P. vivax* o *P. ovale*; infine se sono fini e di color rosa si tratta delle punteggiature di Ziemann,

presenti nell'infezione da *P. malariae*.

Inoltre, nelle infezioni da *P. falciparum*, gli eritrociti appaiono di dimensioni normali e solitamente si osservano solo trofozoiti e gametociti. Nelle infezioni da *P. vivax*, invece, gli eritrociti possono essere di dimensioni normali, o leggermente aumentate, possono avere una morfologia alterata a causa dei movimenti ameboidi del plasmodio e, in condizioni ottimali, si possono osservare le granulazioni di Schüffner. Nelle infezioni da *P. ovale*, gli eritrociti possono essere normali o leggermente ingranditi, di solito hanno forma da tondeggiante ad ovale, talvolta sono fimbriati, con frange e, in condizioni ottimali, si possono osservare le granulazioni di Schüffner. Infine, nelle infezioni da *P. malariae*, gli eritrociti sono normali o più piccoli del normale.

Le analisi morfologiche del plasmodio in microscopia richiedono tempo e soprattutto specifiche competenze, che devono essere mantenute ed incrementate anche tramite la partecipazione a specifici programmi di VEQ (45-48). Esiste pertanto la necessità di metodi sensibili e convenienti per poter valutare efficacemente tutti i campioni, soprattutto quando il carico di lavoro è elevato, in modo da non perdere nessun caso (7,49).

## Referto

La richiesta di ricerca del parassita malarico riveste sempre un ruolo di urgenza/emergenza clinica, quindi il referto deve essere garantito in tempi congrui alle esigenze cliniche: i tempi possono variare dai 60 ai 90 minuti dal momento in cui il campione arriva in laboratorio. In particolare, i tempi dovrebbero essere 30 minuti circa per preparare lo striscio ed altri 15-20 minuti per l'esame microscopico più il tempo necessario per la refertazione.

Nel referto dell'esame microscopico dovrebbe essere riportata la specie del parassita, l'indice di parassitemia come indicato più sopra e gli eventuali stadi di maturazione del parassita: trofozoiti, schizonti e gametociti.

Infine, nel caso di riscontro all'esame emocromocitometrico di allarmi specifici o non specifici, e/o di citogrammi strumentali suggestivi di presenza di parassita malarico, va eseguita la revisione microscopica del campione su striscio di sangue periferico, orientata alla ricerca del parassita stesso, delle anomalie delle emazie e delle anomalie tipiche delle popolazioni leucocitarie (ad esempio presenza di linfociti attivati o reattivi, monociti e/o granulociti neutrofili che hanno fagocitato granuli di emozina e/o emazie parassitate) in presenza di infezione malarica. Se disponibile, si suggerisce di eseguire anche un test rapido in relazione agli algoritmi diagnostici specifici di ogni laboratorio.

Il riscontro di malaria, specialmente se occasionale o la segnalazione di sospetto di infezione malarica, devono essere comunicati e gestiti con tutte le specifiche definite per la gestione dei risultati critici in accordo con le raccomandazioni oggi disponibili e le regole e/o procedure adottate dal laboratorio (1, 50, 51).

## ALTRI ESAMI DI LABORATORIO

Negli ultimi anni sono state sviluppate nuove tecniche per la diagnosi della malaria, al fine di consentirne una esecuzione diffusa (52-54).

### I test diagnostici rapidi (RDTs)

Gli RDTs rilevano antigeni parassita-specifici in una goccia di sangue fresco mediante tecnica immunocromatografica (52). L'OMS ha pubblicato una lista di produttori di RDTs (49), certificati secondo le norme ISO:13485:2003 o 21CFR 820 della "Food and Drug Administration" statunitense (FDA) e rispondenti alle prestazioni richieste dalla OMS (55).

Gli RDTs non necessitano di un laboratorio o di un equipaggiamento speciale, sono semplici da usare e possono dare risultati positivi o negativi entro 15 minuti (54). Pertanto, gli RDTs sono generalmente adatti per aree remote con strutture limitate e personale relativamente non formato. Tuttavia, hanno una durata di conservazione limitata e devono essere mantenuti asciutti e lontani da temperature estreme. Inoltre, possono dare falsi negativi, in caso di bassa parassitemia sul sangue periferico, o nei bambini piccoli con scarsa immunità; si possono avere anche falsi positivi, a causa di reazioni trasversali o gametocitemia (56).

Gli RDT sono sempre più utilizzati come strumento per la diagnosi della malaria, sia in ambiente endemico che in ambiente non endemico, in quanto rappresentano una valida alternativa qualora non sia possibile garantire per gli operatori un livello di competenza elevato per l'esame microscopico. Pertanto, è importante partecipare ai programmi di VEQ, che ne garantiscano l'armonizzazione (57).

### Metodo "quantitative Buffy Coat" (QBC)

Il metodo QBC consente di rilevare i parassiti della malaria in modo molto rapido (durata variabile da 10 secondi a 3 minuti). Si basa sul principio della stratificazione a gradiente di densità delle cellule ematiche in capillari da ematocrito dopo centrifugazione e sulla caratteristica di tutti i microrganismi non normalmente presenti nel sangue, di concentrarsi in modo caratteristico lungo il gradiente di densità del capillare. L'evidenziazione dei microrganismi è resa possibile dall'arancio di acridina (AO) contenuto nel capillare, che li colora in modo caratteristico ed inequivocabile durante l'osservazione del capillare al microscopio a fluorescenza (58).

La diagnosi di malaria con il metodo QBC è più sensibile dell'analisi morfologica a microscopio dello striscio di sangue, da un lato perché il volume di sangue sottoposto a screening per l'infezione parassitaria è maggiore (50-70  $\mu$ L), dall'altro perché il metodo QBC concentra la maggior parte dei parassiti nella zona stretta dei capillari (49, 52-54).

Il metodo QBC è però tecnicamente impegnativo e richiede attrezzature specializzate per separare gli strati

cellulari mediante centrifugazione e un buon microscopio a fluorescenza.

Sebbene l'AO dia una fluorescenza molto intensa, non è specifico e colora gli acidi nucleici di tutti i tipi di cellule. Di conseguenza, l'operatore deve essere specificamente formato a distinguere i parassiti colorati da AO dalle altre cellule e detriti cellulari contenenti acidi nucleici (59).

### Diagnosi molecolare mediante amplificazione genica

L'analisi morfologica a microscopio dello striscio di sangue può comunque non essere in grado di differenziare le specie di *Plasmodium*, ad esempio nei casi in cui le caratteristiche morfologiche si sovrappongono (specialmente *P. vivax* e *P. ovale*), così come nei casi in cui la morfologia sia stata alterata dal trattamento farmacologico o dalla conservazione inadeguata del campione. In tali circostanze, le specie di *Plasmodium* possono essere caratterizzate utilizzando test diagnostici molecolari (60). L'impiego di questi test ha inoltre il vantaggio di poter rilevare la presenza del parassita in campioni in cui la parassitemia sia inferiore alla sensibilità dello striscio di sangue periferico (60).

Il DNA genomico di *Plasmodium* viene estratto da sangue intero, utilizzando diversi kit disponibili in commercio. Per la rilevazione e l'identificazione a livello di specie può essere eseguita una RealTime PCR (60). Si tratta di un test duplex che rileva *P. falciparum* e *P. vivax* in una reazione e *P. malariae* e *P. ovale* in una reazione parallela, usando sonde molecolari TaqMan specifiche per ciascuna specie (60).

Recentemente per l'identificazione del *Plasmodium spp* è disponibile una tecnica di amplificazione isoterma, la tecnologia "Loop-mediated Isothermal Amplification" (LAMP) (61). Essa presenta notevoli vantaggi rispetto alle tradizionali tecniche di amplificazione: non necessita di strumentazioni sofisticate come i termociclatori, può essere eseguita da personale non specializzato, è altamente sensibile e specifica. Tutte queste caratteristiche fanno sì che essa possa essere utilizzata al di fuori dei laboratori diagnostici, come nei "Point of Care Testing", con le stesse caratteristiche della Real-time PCR (61).

Analogamente all'analisi morfologica al microscopio, anche lo studio del DNA genomico di *Plasmodium* richiede tempo e soprattutto specifiche competenze, che pertanto devono essere mantenute ed incrementate anche tramite la partecipazione a specifici programmi di VEQ (62).

### Ruolo della citometria a flusso nell'identificazione dei parassiti malarici

Per sua intrinseca natura, la citometria a flusso costituisce un candidato ideale all'analisi di un campione di sangue periferico proveniente da un soggetto malarico. Infatti, oltre alla sua capacità di analizzare ogni singola cellula in modo distinto, la

citometria a flusso permette l'esecuzione di un numero di conteggi così elevato da assicurare una soddisfacente robustezza statistica anche in presenza di un basso numero di cellule significative e costituisce la tecnica naturale per un campione, che già nelle sue condizioni originarie si presenta in uno stato di monodispersione (63, 64).

#### *Identificazione delle emazie parassitate*

L'identificazione delle emazie parassitate si basa sulla dimostrazione, nel contesto del globulo rosso, di attività metaboliche o di strutture molecolari proprie del patogeno, consistenti, queste ultime, nei suoi acidi nucleici, detti anche acidi nucleici esogeni.

Tuttavia, a causa delle difficoltà riscontrate nel distinguere tra DNA malarico e RNA ribosomiale presente nei reticolociti e nelle piastrine reticolate (65-69), negli ultimi anni i progressi compiuti dalla citometria a flusso nel campo della diagnostica della malaria si sono focalizzati soprattutto sull'evidenziazione di metaboliti ad esso riconducibili ed in particolare sull'evidenziazione dell'emozoina (64, 70-73).

L'emozoina non è una molecola fluorescente, ma possiede comunque una serie di proprietà che la rendono perfettamente rilevabile in citometria a flusso. L'emozoina è infatti birifrangente (71) ed è in grado di depolarizzare una radiazione elettromagnetica polarizzata: questa capacità è implementata in una classe di contaglobuli presenti in commercio, nei quali viene sfruttata per l'evidenziazione degli eosinofili (72). In modo non inatteso, la diffusa disponibilità di questa tecnologia nei laboratori clinici ha rapidamente condotto all'accumularsi di una serie di segnalazioni, riguardanti la comparsa di eventi dotati di elevati valori di scatter depolarizzato nel sangue periferico di soggetti affetti da malaria (33, 73-74). L'evidenziazione di questi eventi, interpretabili come neutrofili o monociti emozoina-positivi, può giocare un ruolo fondamentale nella diagnosi dell'infezione malarica, anche se sussistono diversi interrogativi riguardanti la sensibilità e la specificità del reperto (34, 75-79), la sua dipendenza dalla storia clinica del paziente (77, 78) e la sua relazione con le diverse possibili specie di *Plasmodium* (79). Per certo, si è aperta una strada verso la determinazione dell'emozoina in citometria a flusso automatizzata (80).

#### CONCLUSIONI

La bassa incidenza di nuove diagnosi nei paesi industrializzati, nonostante la disponibilità di programmi di VEQ mirati, non sempre permette di mantenere un livello di competenza adeguato degli operatori nel riconoscimento della malaria all'osservazione microscopica dei preparati. Per questo motivo, al fine di garantire una diagnosi precoce e corretta dell'infezione, può essere importante l'impiego di metodi diagnostici alternativi alla microscopia ottica (35-38; 49,52,53).

Gli emocitometri di ultima generazione possono

essere un valido supporto per lo screening della malaria anche in paesi non endemici (12-14, 25), anche se sensibilità e specificità sono strettamente dipendenti dalle caratteristiche dello strumento a disposizione, dalla entità della parassitemia e dallo stadio maturativo del parassita. L'osservazione delle alterazioni dei grafici strumentali (citogrammi) del conteggio differenziale leucocitario e le alterazioni del conteggio reticolocitario possono suggerire la presenza del parassita malarico ai diversi stadi maturativi del ciclo vitale, trofozoite, schizonte e gametocita (17-20, 28) con sensibilità e specificità adeguate ad orientare il sospetto diagnostico.

L'esame emocromocitometrico può quindi essere una valida alternativa ai metodi più specifici, innanzitutto perchè rappresenta una delle indagini di base effettuate invariabilmente su qualsiasi paziente febbrile. È inoltre un esame semplice, rapido e relativamente a basso costo

Gli emocitometri forniscono oltre a parametri quantitativi standard, quali il conteggio dei diversi tipi cellulari e la misura dell'emoglobina, anche una serie di altri parametri strettamente metodo/strumento dipendenti quali allarmi morfologici, rappresentazioni grafiche delle cellule analizzate, citogrammi per leucociti, piastrine, emazie e reticolociti.

In particolare, la valutazione delle anomalie dei citogrammi negli emocromi, oltre a rendere il sospetto diagnostico di infezione malarica semplice, rapido e disponibile in qualsiasi laboratorio, può rappresentare un ottimo ausilio nel rilevamento precoce dell'infezione malarica e può consentire la segnalazione di un sospetto diagnostico di malaria anche (e forse soprattutto) in pazienti per i quali l'infezione non era sospettata (12-14, 25).

Come documentato nella presente rassegna, l'esame emocromocitometrico rappresenta un valido supporto nella pratica routinaria per lo screening di malaria, con caratteristiche peculiari dipendenti dalla strumentazione, anche se va sottolineato come l'accuratezza degli analizzatori ematologici dipenda comunque sempre dalla carica parassitemica, dallo stadio maturativo, dalla specie di *Plasmodium* e dall'immunità del soggetto in esame (81).

Va comunque sempre sottolineato che le potenzialità diagnostiche della citometria a flusso devono essere sempre integrate dalla competenza del professionista di laboratorio, che con l'ausilio del contesto clinico all'interno del quale la richiesta dell'esame è effettuata, deve essere in grado di interpretare correttamente le anomalie dei citogrammi e gli algoritmi diagnostici forniti.

#### CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

#### BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization; World Malaria Report 2017. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158\\_eng.pdf?http://apps.who.int/iris/b](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf?http://apps.who.int/iris/b)

- itstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1 (ultimo accesso: maggio 2018).
2. Center for Disease Control and Prevention. Anopheles Mosquitoes. Available at: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes> (ultimo accesso: maggio 2018).
  3. Chin W, Contacos PG, Coatney GR, et al. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science* 1965;149:865.
  4. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:165-84.
  5. Centro Europeo per il Controllo delle malattie (ECDC). Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/malaria/Pages/index.aspx> (ultimo accesso: maggio 2018).
  6. Ministero della Salute, Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria, Ufficio Prevenzione delle Malattie Trasmissibili e Profilassi Internazionale: 0036391-27/12/2016-DGPRES-DGPRES-P. Available at: <http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2016&codLeg=57366&parte=1%20&serie=null> (ultimo accesso: maggio 2018).
  7. Campuzano Zulaga G, Hanscheid T, Grobusch MP. Automated haematology analysis to diagnose malaria. *Malar J* 2010;9:346.
  8. Briggs C, Da Costa A, Freeman L, et al. Development of an automated malaria discriminant factor using VCS technology. *Am J Clin Pathol* 2006;126:691-8.
  9. Singh A, Narang V, Sood N, et al. Malaria diagnosis using automated analysers: a boon for hematopathologists in endemic areas. *JCDR* 2015;9:EC05-EC08.
  10. Campuzano-Zuluaga G, Álvarez-Sánchez G, Escobar-Gallo GE, et al. Design of malaria diagnostic criteria for the Sysmex XE-2100 hematology analyzer. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:402-11.
  11. Capizzi B, Suppi R, Graziani MS. Due casi di malaria diagnosticati incidentalmente con un analizzatore ematologico. *Biochim Clin* 2012;36:204-8.
  12. Jain M, Gupta S, Jain J, et al. Usefulness of automated cell counter in detection of malaria in a cancer set up-Our experience. *Indian J Pathol Microbiol* 2012;55:467-73.
  13. Sharma S, Sethi N, Pujani M, et al. Abnormal WBC scattergram: a clue to the diagnosis of malaria. *Hematol* 2013;18:101-5.
  14. Mubeen KH, Devadoss CW, Rangan RA, et al. Automated hematology analyzers in diagnosis of plasmodium vivax malaria: an adjunct to conventional microscopy. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014;6:e2014034.
  15. Ochi Y. Overview of the automated hematology analyzer XN-Series. *Sysmex J*, 2011;34:31-46.
  16. Sunilkumar KB, Preeti Naik. Usefulness of automated hematology analyzer Sysmex XN 1000 in detection of malaria. *IJPO* 2016;3:658-61.
  17. Buoro S, Manenti B, Seghezzi M, et al. Abnormal scattergrams generated by fully-automated hematological analyzers: new tools for screening malaria infection? *Int J Lab Hematol* 2018; doi: 10.1111/ijlh.12790.
  18. Pipitone S, Bonelli P, Benegiamo A, et al. A case of malaria in suspected pneumonia. *Euromedlab IFCC* 2013; Available at: <https://www.epo.org/index.html> (ultimo accesso: maggio 2018).
  19. Brevetto EP2635695 (A1). Method for detecting a plasmodium infection. Available at: <http://www.epo.org/learning-events/european-inventor/finalists/2017/vanden-boogaart.html> (ultimo accesso: maggio 2018).
  20. Lee HK, Kim SI, Chae H, et al. Sensitive detection and accurate monitoring of Plasmodium vivax parasites on routine complete blood count using automatic blood cell analyzer (DxH800(TM)). *Int J Lab Hem* 2012;34:201-7.
  21. Bhide M, Parekh V. Screening for malaria using mindray BC-6800 automated hematology analyzer. Abstract 103. *Int Jnl Lab Hem* 2014;36:1-136.
  22. Bhide M, Parekh V. Screening for malaria using Mindray BC-6800 automated hematology analyzer. Abstract 120. *Int Jnl. Lab Hem* 2012;34:1-180.
  23. Kramer B, Grobusch, MP, Suttrop N, et al. Relative frequency of malaria pigment-carrying monocytes of nonimmune and semi-immune patients from flow cytometric depolarized side scatter. *Cytometry* 1999;45:133-40.
  24. Shin S, Park SH, Park J. Incidental identification of Plasmodium vivax during routine complete blood count analysis using the UniCel DxH 800. *Ann Lab Med* 2018;38:165-8.
  25. Hänscheid T. Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:497-504.
  26. Hanscheid T, Pinto BG, Cristino JM, et al. Malaria diagnosis with the haematology analyser Cell-Dyn 3500: what does the instrument detect? *Clin Lab Haematol* 2000;22:259-61.
  27. Fawzi ZO, Fakhro NA, Nabhan RA, et al. Differences in automated depolarization patterns of Plasmodium falciparum and P. vivax malaria infections defined by the Cell-Dyn CD4000 haematology analyser. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003;97:71-9.
  28. Mohapatra S, Samantaray JC, Arulselvi S, et al. Comparative evaluation of two flow cytometric analysers as diagnostic tools for the automated detection of malaria. *Ann Clin Lab Sci* 2014;44:82-6.
  29. Mohapatra S, Samantaray JC, Arulselvi S, et al. Automated detection of malaria with haematology analyzer Sysmex XE-2100. *Indian J Med Sci* 2011;65:26-31.
  30. Yoo JH, Song J, Lee KA, et al. Automated detection of malaria-associated pseudo-eosinophilia and abnormal WBC scattergram by the Sysmex XE-2100 hematology analyzer: a clinical study with 1,801 patients and real-time quantitative PCR analysis in vivax malaria-endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:412-4.
  31. Campuzano Zuluaga G, Alvarez-Sánchez G, Escobar-Gallo GE, et al. Design of malaria diagnostic criteria for the Sysmex XE-2100 hematology analyzer. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:402-11.
  32. Dubreuil P, Pihet M, Cau S, et al. Use of Sysmex XE-2100 and XE-5000 hematology analyzers for the diagnosis of malaria in a nonendemic country (France). *Int J Lab Hematol* 2014;36:124-34.
  33. Mendelow BV, Lyons C, Nhlangothi P, et al. Automated malaria detection by depolarization of laser light. *Br J Haematol* 1999;104:499-503.
  34. Padial MM, Subirats M, Puente S, et al. Sensitivity of laser light depolarization analysis for detection of malaria in blood samples. *J Med Microbiol* 2005;54:449-52.
  35. Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. Available at: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/> (ultimo accesso: maggio 2018).
  36. World Health Organization, TDR. Microscopy for the detection, identification and quantification of malaria parasites on stained thick and thin blood films in research settings. 2015:19-30. Available at: [http://www.who.int/tdr/publications/microscopy\\_detec\\_ident\\_quantif/en/](http://www.who.int/tdr/publications/microscopy_detec_ident_quantif/en/) (ultimo accesso: maggio 2018).
  37. Methods manual Microscopy for malaria in research settings. Available at: [http://www.finddx.org/wpcontent/uploads/2016/03/WHO-TDR-2015\\_Methods\\_manual\\_Microscopy-for-malaria-in-researchsettings.pdf](http://www.finddx.org/wpcontent/uploads/2016/03/WHO-TDR-2015_Methods_manual_Microscopy-for-malaria-in-researchsettings.pdf) (ultimo accesso: maggio 2018).
  38. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, et al. A review of

- malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:119-27.
39. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:66-78.
  40. Mosca A, Basilico N, Grande R, et al. Aspetti biologici e clinici della malaria: progressi verso l'eradicazione della malattia. *Biochimica Clinica* 2011;35:442-57.
  41. UK NEQAS: Effects of anticoagulant on malarial parasites. Available at: [http://www.ukneqasmicro.org.uk/parasitology/images/pdf/BloodParasitology/MalariaSpecie s/EDTA\\_Effects.pdf](http://www.ukneqasmicro.org.uk/parasitology/images/pdf/BloodParasitology/MalariaSpecie s/EDTA_Effects.pdf) (ultimo accesso: maggio 2018).
  42. Centers for Disease Control and Prevention. Staining for malaria parasites. Available at: [https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Malaria\\_staining\\_bench aid.pdf](https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Malaria_staining_bench aid.pdf) (ultimo accesso: maggio 2018).
  43. Clinical Laboratory Standard Institute. Laboratory diagnosis of blood-borne parasitic diseases; approved guideline. CLSI Document M15-A, - CLSI: Wayne, PA, 2000. Available at: [https://clsi.org/media/1467/m15a\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1467/m15a_sample.pdf) (ultimo accesso: maggio 2018).
  44. Centro per le Malattie Tropicali. Ospedale di Negrar (Verona). Ricerca malaria in emoscopia diretta. Available at: <http://www.tropicalmed.eu/Page/WebObjects/Page TropE.woa/wa/displayPage?name=Metodo+GS+SS> (ultimo accesso: maggio 2018).
  45. VEQ Parassitologia Careggi. Available at: <http://www.aou-careggi.toscana.it/crrveq/programmiveq.php?br=6> (ultimo accesso: maggio 2018).
  46. VEQ UKNEQAS Parasitology. Available at: <http://www.ukneqasmicro.org.uk/parasitology/index.php/blood-parasitology> (ultimo accesso: maggio 2018).
  47. VEQ Parassitologia BIODEV. Available at: <http://www.biodev.com/DOWNLOAD/ALL/SITO/PA1914A R1.pdf> (ultimo accesso: maggio 2018).
  48. VEQ Parassitologia CAP. Available at: [https://estore.cap.org/OA\\_HTML/xxCAPibeCCTpltmDspRt e.jsp?section=10400&item=501137&sitex=10020:22372: US](https://estore.cap.org/OA_HTML/xxCAPibeCCTpltmDspRt e.jsp?section=10400&item=501137&sitex=10020:22372: US) (ultimo accesso: maggio 2018).
  49. World Health Organization; Malaria rapid diagnostic tests, 2016. Available at: [http://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/rapid\\_diagnostic\\_tests/en](http://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/rapid_diagnostic_tests/en) (ultimo accesso: maggio 2018).
  50. Piva E, Balboni F, Banfi G, et al. Raccomandazioni per l'identificazione e la gestione dei risultati critici nei laboratori clinici. *Biochim Clin* 2018;42:167-79.
  51. Keng T, De La Salle B, Bourner G, et al. Standardization of haematology critical results management in adults: international council for standardization in haematology, ICSH, survey and recommendations. Available at: <https://doi.org/10.1111/ijlh.12526> (ultimo accesso: maggio 2018).
  52. World Health Organization. Recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests, 2015. Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/rdt-selectioncriteria.pdf> (ultimo accesso: maggio 2018).
  53. Centers for disease control and prevention. Rapid diagnostic tests: how they work. Available at: [https://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/reduction/dx\\_rdt.html](https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/dx_rdt.html) (ultimo accesso: maggio 2018).
  54. Talman AM, Duval L, Legrand E, et al. Evaluation of the intra and inter-specific genetic variability of Plasmodium lactate dehydrogenase. *Mal J* 2007;6:140.
  55. Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 7 (2015-2016). Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/978924151268/en> (ultimo accesso: maggio 2018).
  56. Kakkilaya BS. Rapid diagnosis of malaria. *Lab Med* 2003;34:602-8.
  57. VEQ NEQAS per RDTs. Available at: <http://www.ukneqasmicro.org.uk/parasitology/index.php/rapid-diagnostic-tests-for-malaria> (ultimo accesso Maggio 2018).
  58. Secardin Y, Le Bras J. Diagnostic test to identify human Plasmodium species by the quantitative buffy coat test. *Med Trop* 1999;59:276-8.
  59. Delacollet D, Van der Stuyft P. Direct acridine orange staining is not a 'miracle' solution to the problems of malaria diagnosis in the field. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:187-8.
  60. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, et al. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol* 2004;42:5636-43.
  61. Serra-Casas E, Manrique P, Ding X C, et al. Loop-mediated isothermal DNA amplification for asymptomatic malaria detection in challenging field settings: Technical performance and pilot implementation in the peruvian amazon. *PLoS ONE* 2017;12, e0185742.
  62. VEQ NEQAS per molecular detection. Available at: <http://www.ukneqasmicro.org.uk/parasitology/index.php/molecular-detection-of-malaria> (ultimo accesso: maggio 2018).
  63. Shapiro HM, Apte SH, Chojnowski GM, et al. Cytometry in malaria - a practical replacement for microscopy? *Curr Protoc Cytom* 2013; doi: 10.1002/0471142956.cy1120s65.
  64. Jacobberger JW, Horan PK, Hare JD. Analysis of malaria parasite-infected blood by flow cytometry. *Cytometry* 1983;4:228-37.
  65. Campo JJ, Aponte JJ, Nhabomba AJ, et al. Feasibility of flow cytometry for measurements of Plasmodium falciparum parasite burden in studies in areas of malaria endemicity by use of bidimensional assessment of YOYO-1 and autofluorescence. *J Clin Microbiol* 2011;49:968-74.
  66. Makler MT, Lee LG, Recktenwald D. Thiazole orange: a new dye for Plasmodium species analysis. *Cytometry* 1987;8:568-70.
  67. Gerena Y, Gonzalez-Pons M, Serrano AE. Cytofluorometric detection of rodent malaria parasites using red-excited fluorescent dyes. *Cytometry A* 2011;79:65-972.
  68. Grimberg BT, Erickson JJ, Sramkoski RM, et al. Monitoring Plasmodium falciparum growth and development by UV flow cytometry using an optimized Hoechst-thiazole orange staining strategy. *Cytometry A* 2008;73:546-54.
  69. Grimberg BT. Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites. *J Immunol Methods* 2011;367:1-16.
  70. Lawrence C, Olson JA. Birefringent hemozoin identifies malaria. *Am J Clin Pathol* 1986;86:360-3.
  71. Maude RJ, Buapetch W, Silamut K. A simplified, low-cost method for polarized light microscopy. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:782-3.
  72. Grobusch MP, Hänscheid T, Krämer B, et al. Sensitivity of hemozoin detection by automated flow cytometry in non- and semi-immune malaria patients. *Cytometry* 2003;55:46-51.
  73. Hänscheid T, Pinto BG, Pereira I, et al. Avoiding misdiagnosis of malaria: a novel automated method allows specific diagnosis, even in the absence of clinical suspicion. *Emerg Infect Dis* 1999;5:836-8.
  74. Scott CS, van Zyl D, Ho E, et al. Automated detection of malaria-associated intraleucocytic haemozoin by Cell-Dyn CD4000 depolarization analysis. *Clin Lab Haematol* 2003;25:77-86.
  75. Hänscheid T, Melo-Cristino J, BG Pinto. Automated

- detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal. *Am J Trop Med Hyg* 2001;64:290-2.
76. Hanscheid T, Romão R, Grobusch MP, et al. Limitation of malaria diagnosis with the Cell-Dyn(R) analyser: not all haemozoin-containing monocytes are detected or shown. *Int J Lab Hematol* 2011;33:e14-6.
77. Hänscheid T, Pinto BG, Cristino JM, et al. Malaria diagnosis with the haematology analyser Cell-Dyn 3500: what does the instrument detect? *Clin Lab Haematol* 2000;22:259-61.
78. Hänscheid T, Längin M, Lell B, et al. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. *Malar J* 2008;7:109.
79. Fawzi ZO, Fakhro NA, Nabhan RA, et al. Differences in automated depolarization patterns of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections defined by the Cell-Dyn CD4000 haematology analyser. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003;97:71-9.
80. Rebelo M, Tempera C, Bispo C, et al. Light depolarization measurements in malaria: A new job for an old friend. *Cytometry A* 2015;87:437-45.
81. Bailey JW, Williams J, Bain BJ, et al. General haematology task force of the british committee for standards in haematology. Guideline: the laboratory diagnosis of malaria. General haematology task force of the british committee for standards in haematology. *Br J Haematol* 2013;163:573-80.



## Shaping the epigenetic basis of Werner Syndrome

Tiziana Guastafierro<sup>1,2</sup>, Maria Giulia Bacalini<sup>3</sup>, Domenico Raimondo<sup>4</sup>, Antonella Marcocchia<sup>2,5</sup>, Claudio Franceschi<sup>6,7</sup>, Alberto Spanò<sup>1</sup>, Francesco Bondanini<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Clinical Biochemistry Laboratory, Sandro Pertini Hospital, Rome, Italy

<sup>2</sup>Interdisciplinary, Interdepartmental and Specialistic Reference Center for Early Diagnosis of Scleroderma, Treatment of Sclerodermic Ulcers and Videocapillaroscopy (CRIIS), Sandro

<sup>3</sup>IRCCS Institute of Neurological Sciences, Bologna, Italy

<sup>4</sup>Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

<sup>5</sup>Unit of Ischemic Microangiopathy and Sclerodermic Ulcers, Sandro Pertini Hospital, Rome, Italy

<sup>6</sup>Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine, University of Bologna, Bologna, Italy

<sup>7</sup>Interdepartmental Center "L. Galvani", University of Bologna, Bologna, Italy

<sup>8</sup>Clinical Pathology Laboratory, Saint' Eugenio Hospital, Rome, Italy

### ABSTRACT

Werner syndrome is an autosomal recessive genetic disease responsible for a progeroid disorder including a plethora of premature clinical signs traditionally associated with physiological ageing. The molecular alterations that lead to all phenotypes associated the disease remain still unidentified. Here we describe our recent findings and results from literature about the possibility that epigenetic changes could be associated with Werner syndrome phenotype. Recent literature evidences that epigenetic mechanisms are at the basis of both physiological and pathological processes, like insulin production and secretion. Analysis of genome-wide DNA methylation profile in the whole blood from patients affected by Werner syndrome demonstrated enrichment of hypermethylated probes in glycosphingolipid biosynthesis, FoxO signalling and insulin signalling pathways, while hypomethylated probes were enriched in PI3K-Akt signalling and focal adhesion pathways. Twenty-two differentially methylated genes belonging to the enriched pathways resulted differentially expressed in Werner syndrome fibroblasts. DNA methylation profiles analysis in Werner syndrome patients revealed differentially methylated regions in genes involved in other ageing phenotypes or associated syndromes like systemic sclerosis, dyskeratosis congenita and Down syndrome. Genome-wide epigenetics changes observed in the peripheral blood from patients with Werner syndrome provide new insight in the pathogenesis of the disease, highlighting in some cases a functional correlation of gene expression and methylation status.

### EPIGENETICS

Epigenetics is one of the most open and rapidly developing fields of biological research (1) as several lines of evidence suggest that environmental factors can have a significant impact on the onset and progression of many diseases, possibly by affecting epigenetic modifications (2). The term epigenetics is referred to heritable changes in gene function reflecting on phenotype, without inducing genetic mutation (2). Epigenetic processes include modifications of either DNA (e.g. cytosine methylation and hydroxymethylation), histone proteins modification (e.g. lysine acetylation, lysine and arginine methylation, serine and threonine phosphorylation, and lysine ubiquitination and

sumoylation) (3) or miRNA (4). DNA methylation has received a growing attention in the molecular characterization of epigenetic modifications, also thanks to the availability of affordable methods for their analysis. High-throughput and high-resolution sequencing technologies have enabled the possibility of mapping the human genome-wide and gene-targeted DNA methylation patterns (1). DNA methylation studies were carried out on monozygotic twins highlighting that the genome of young pairs is epigenetically similar while it is clearly dissimilar in aged ones (5). Aging-associated DNA methylation changes are particularly evident in monozygotic twins who had spent a long period of their life apart (6, 7). DNA methylation changes can be mediated by several extrinsic factors deriving from

Corrispondenza a: Francesco Bondanini, P.le dell'Umanesimo 10, 00144 Roma. Tel. 0651001, E-mail francesco.bondanini@aslroma2.it

Ricevuto: 24.01.2018

Revisionato: 14.02.2018

Accettato: 10.05.2018

Pubblicato on-line: 18.07.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.041

lifestyle, diet and environmental exposure which can negatively or positively affect lifespan (6, 7). For example, smoking attitude negatively affects lifespan by inducing DNA methylation changes of genes involved in age-associated diseases such as cardiovascular pathologies and cancer (8, 9). On the contrary, physical activity, antioxidant intake and caloric restriction may exert anti-aging action also by counteracting DNA methylation changes (10-12). These factors influence DNA methylation patterns altering the availability of the DNA methyltransferase cofactor S-Adenosyl methionine (SAM) or directly interfering with the regulation of DNA methyltransferase enzymes (13, 14).

### DNA methylation

DNA methylation pattern is established by the *de novo* DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) and Dnmt3b enzymes and maintained by the activity of Dnmt1 during replication (15). These enzymes catalyze the addition of a methyl group to the DNA, mostly at deoxycytidine-phosphate-deoxyguanosine (CpG) sites, using SAM as a methyl donor and converting cytosine to 5-methylcytosine (16). The unmethylated CpGs are essentially clustered in promoter regions of housekeeping genes called CpG islands (CGI) which are regions of more than 500 base pairs characterized by at least 50% of CG content (17). The unmethylated state of CGIs is essential for the expression of the correlated genes (18); in fact, the 60% of CGIs associated with unmethylated promoters of annotated gene allow the transcription of the correlated genes (17, 18). Some repeat sequences are rich in methylated CpG (mCpG); the maintaining of their methylate state is important for the correct cell functions (18-20). Therefore, many tumor suppressor genes need to maintain the unmethylated state of the CGIs in their promoter, as increasing in CpGm in these regions induces their downregulation triggering cell toward cancer (20, 21); in contrast, chromatin decondensation (22), genomic instability (23), apoptosis (24), cancer (25), and even mitotic catastrophe (26) can be induced by DNA hypomethylation.

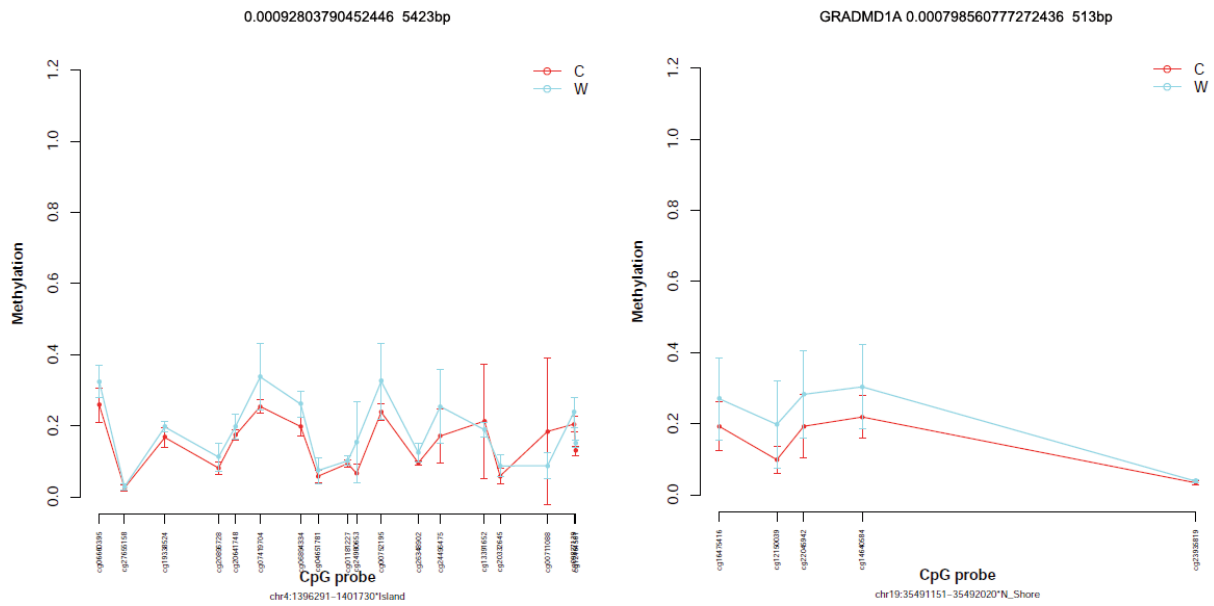
### WERNER SYNDROME

Werner syndrome (WS) is a rare adult premature ageing disease caused by *WRN* gene mutation (27, 28). Data updated to 2017 estimated that incidence of WS is 1 case up to 1 million individuals in the United States without racial or sex predilection (29). WS is more common in Japan and Sardinia than in other regions indeed; out from 1000 cases reported in the world, more than 800 are reported in Japan (30). The prevalence of Werner syndrome varies with the level of consanguinity in populations. In the Japanese population, the frequency ranges from about 1:20,000 to 1:40,000, based on the frequencies of detectable heterozygous pathogenic variants (31). Similarly, in the Sardinian population, the frequency is estimated at 1:50,000 (32).

Based on the population allele frequency of the most common pathogenic variant, c.1105C>T (rs17847577), which accounts for approximately 20% of pathogenic alleles, the prevalence of WS is estimated at 1:380,000-1:1,000,000 (33). *WRN* gene encodes a 180-kDa nuclear protein member of the RecQ subfamily of helicases (28, 34). DNA helicases are involved in many aspects of DNA metabolism including transcription, replication and recombination (34). *WRN* plays a critical role in the repair of DNA double-strand breaks (35). Additionally, recent studies suggest a role for *WRN* in maintaining DNA telomere stability (36). Defects in telomere structure and in DNA repair mechanisms as well as chromosomal instability are age-associated biomarkers which may have a strong impact on human health, leading to premature ageing (37-39). Concerning clinical manifestations, WS patients have a normal development until about 30 years old, when they begin to show ageing signs like greying or loss of hair, birdlike faces, sclerodermiform skin atrophy (19). Other symptoms, generally associated to physiological ageing are: cataract, type 2 diabetes mellitus, sensorineural hearing loss, premature atherosclerosis and dyslipidemia.

### COMMON EPIGENETIC ALTERATIONS BETWEEN WERNER SYNDROME AND AGEING CONNECTED PATHWAYS

While it is well known that individuals suffering of WS exhibit many clinical signs of accelerated aging, little is known about the association of epigenetic alterations with WS (40, 41). Recent studies proposed to measure the physiological age of tissue samples and organs including blood, brain, breast, kidney, liver, and lung according to a DNA methylation based biomarker of aging (the so called Epigenetic Clock) (40). In particular, the estimated resulting age estimate (in units of years) is referred to as DNA methylation age (DNAm age) or epigenetic age. Epigenetic clock was applied to a dataset including the whole blood from WS patients and age-matched controls, demonstrating that the disease is associated with an increase in epigenetic age (41). Recently, Guastafierro and colleagues analyzed genome-wide DNA methylation profile in WS patients and age- and sex-matched controls (CTRs) identifying 1125 differentially methylated positions (DMPs) between WS and CTRs patients by ANOVA (19). Of these, 511 probes (mapping in 382 genic regions) were hypermethylated and 614 probes (mapping in 416 genic regions) were hypomethylated (19) (Figure 1 and Table 1). Between the two groups, 87/511 hypermethylated and 110/614 hypomethylated probes had mean methylation differences larger than 0.15, which represents the suggested threshold for mean DNA methylation difference (19, 42). The biological functions of differential DMPs found in WS patients was analyzed *in silico* using a gene set enrichment analysis (19). Guastafierro T et al (19) used the list of genes



**Figure 1**  
 Differential DNA methylation profile of the CpG islands. The two showed probes have been randomly chosen among all that obtained from analyses. C, Control patients; W, Werner syndrome patients; CpG, deoxycytidina-phosphate-deoxyguanosine; CHR, chromosome.

**Table 1**  
 List of the top 10 differentially methylated positions (DMPs)

Probe	CHR	MAP INFORMATION	Gene	CpG island name	Relation respect to the CpG island	p-value
cg15294279	3	174842010	NAALADL2			9.48E-10
cg26845082	3	13555664				6.75E-09
cg23432430	12	125538377		chr12:125534060-125534527	S_Shelf	8.75E-09
cg13956086	5	158691793	UBLCP1	chr5:158690013-158690541	S_Shore	1.05E-08
cg16995742	7	2434521				1.08E-08
cg17779733	2	237992612	COPS8	chr2:237994004-237994876	N_Shore	1.19E-08
cg06052372	22	49589242				7.55E-08
cg06052372	16	83967808				1.04E-07
cg23928292	12	21815474				1.19E-07
cg10360725	8	144139316				3.31E-07

CHR, chromosome; CPG, deoxycytidina-phosphate-deoxyguanosine. Adapted from Guastafierro et al. (19).

associated with DMPs as input for the Enrichr<sup>1</sup> tool which combined P value and z-score. The most highly ranked enriched pathways and significantly overrepresented (those showing a P value < 0.05) were taken into account (19). Results for enriched biological pathways are shown in Table 2 and Figure 2. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed showing hypermethylated genes associated with the enriched “glycosphingolipid biosynthesis (HSA00603)”, “FoxO signalling (HSA-04068)” and “insulin signalling (HSA-04910)” pathways (P value < 0.05) (19). The hypomethylated genes were associated with the enriched “PI3K-Akt signalling (HSA-04151)” and “focal adhesion (HSA-04510)” pathways (P value < 0.05) (19). Finally, these authors (19) identified differentially methylated regions (DMRs) using the pipeline reported by Bacalini MG et al. (43). Twenty-seven DMRs between WS and CTR patients (P value < 0.001) were found, 20 of which were clearly hypermethylated in WS patients compared to CTRs (19). These 27 DMRs, submitted to the Enrichr pathway analysis approach, revealing “sphingolipid metabolism (HSA-00600)” and “sphingolipid signalling pathway (HSA-04071)” among the most enriched pathways (P value < 0.05). Both pathways contain *CERS3* and *CERS1* genes, which are two members of the ceramide synthase family (Table 2 and Figure 2) (19). To assess the differential expression of the genes identified as differentially methylated, the Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession ID: GSE48761) including ten WS and ten CTR skin fibroblasts (44) was exploited (19). Forty-seven genes overlapping with the annotated gene set from KEGG pathways, and 22 out of 47 of these genes were differentially expressed between WR patients and CTRs. Figure 3 reports differential expression found in three representative genes (19). Of note, *CERS3* was shown to exhibit differentially methylated status between WS patients and CTRs (19). This gene is particularly interesting as it regulates sphingolipid synthesis and is involved in the synthesis of ceramides with ultra-long-chain acyl moieties (ULC-Cers) (45). Mutation in *CERS3* is responsible of autosomal recessive congenital ichthyosis (46), and interestingly, scleroderma-like changes have been described in different clinical variants of ichthyosis (47). As reported, pathway enrichment analysis performed on the list of hypermethylated and hypomethylated DMPs and on the list of DMR revealed epigenetic alterations in many genetic pathways possibly related with WS phenotype, like: glycosphingolipids, bioactive sphingolipids, FoxO signal pathway, PI3K-Akt signaling and insulin signaling pathway (19). The significance of the differences in DNA methylation observed in WS patients is not yet been clarified; anyway the pathways involved resulted very interesting in light of the connections identified with physiological and

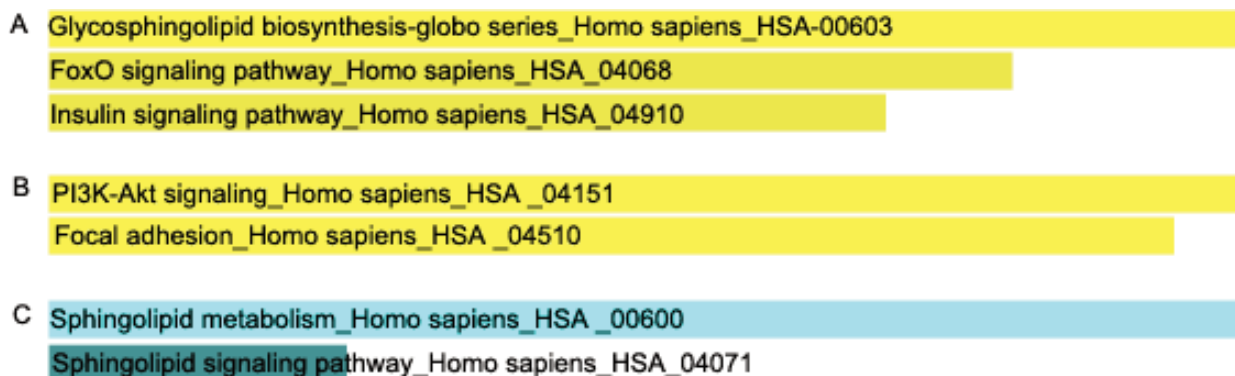
pathological aging processes. Glycosphingolipid level resulted elevated in human fibroblasts obtained from elderly individuals (48), while bioactive sphingolipids play a role in ageing and cellular senescence (33). FoxO proteins are a subgroup of the forkhead family of transcription factors, which regulate the expression of genes involved in apoptosis, cell cycle control, glucose metabolism, oxidative stress resistance and longevity (49, 50). Dysregulation of the insulin/PI3K/Akt pathway is reported in several human diseases like cancer, diabetes, cardiovascular diseases and neurological diseases (51, 52). Insulin signalling pathway regulates ageing in many organisms, ranging from simple invertebrates to mammals, including humans (53). However, it should be noted that epigenetic mechanisms

**Table 2**  
Gene set enrichment analysis

	Enriched Pathways	Overlapping Genes
IPERMETHYLATED	Glycosphingolipid biosynthesis	ST3GAL1, GBGT1, ST3GAL2
	FoxO signal pathway	MAPK10, USP7, AKT2, STAT3, PTEN, FOXO3, SKP2, GABARAP
	Insulin signaling pathway	MAPK10, PTPN1, SHC2, AKT2, PRKAK1B, FASN, TSC2, CRKL
HYPOMETHYLATED	PI3K-Akt signaling	CSF-1R, CDKN1B, TNXB, VWF, LAMA1, FLT4, THBS1, PTK2, LPAR5, PPP2R2B, PPP2R2D, MAPK1, COL6A6, FGFR1, BCL2L1, ITGA9
	Focal adhesion	MAPK10, TNXB, VWF, ROCK2, LAMA1, FLT4, PXN, MAPK1, COL6A6, THBS1, PTK2, ITGA9
	Sphingolipid metabolism	CERS3, CERS1
DMRS	Sphingolipid signaling pathway	CERS3, CERS1

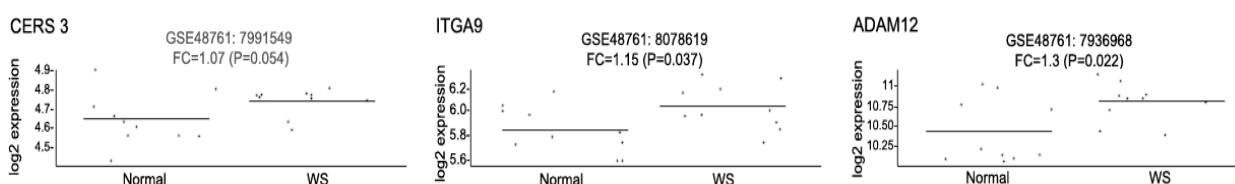
DMR, differentially methylated region. Adapted from Guastafierro et al. (19).

<sup>1</sup>Enrichr is a web server which contains a large collection of diverse gene set libraries generated by genome-wide experiments, available for enrichment analysis. Enrichr is freely available at: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>



**Figure 2**

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Line bars indicates functional classification of KEGG pathway ordered on the basis of significantly enriched pathways



**Figure 3**

Differential expression levels of *CERS3*, *ITGA9* and *ADAM12* genes in WS versus normal controls. WS, Werner syndrome; FC, fold change; P, P value. Adapted from Guastafierro *et al.*

including DNA methylation and histone modulation of noncoding RNAs are at the bases of the regulation of insulin production and secretion (54). In fact, it has been demonstrated that genes involved in the pathogenesis of type 1 Diabetes Mellitus (T1DM), like HLA-DQB1, HLA-DRB1 e GAD2, resulted hypo- or hyper-methylated in patients suffering of T1DM compared with to healthy controls (54). Similarly, acetylation of histone H3K9 in HLA-DRB1 and HLA-DQB1 genes correlates with T1DM (54).

### THE EPIGENETIC CONTACT POINTS BETWEEN SYSTEMIC SCLEROSIS AND WERNER SYNDROME

WS is often misdiagnosed as systemic sclerosis (SSc) as these patients share with SSc patients the main histological changes of skin (55-57). SSc is a complicated autoimmune and connective tissue disease characterized by tissue fibrosis and microangiopathy in the skin and in many other organs and systems. The pathogenesis and treatment of SSc have not been fully elucidated (58). Although SSc is not traditionally considered a disease of aging, SSc-associated fibrosis shares many hallmarks of aging seen in other age-related fibrotic disorders (59). The serological hallmark of SSc is considered the presence of serum autoantibodies directed to multiple intracellular antigens: anti-nuclear antibodies (ANAs) and anti-extractable nuclear antigen antibodies (ENA) [anti-Sjögren's syndrome A (SS-A),

anti-Sjögren's syndrome B (SS-B), anti-Smith (SM), anti-ribonucleoprotein (RNP), anti-topoisomerase I (SCL-70) and anti-histidyl-tRNA synthetase (JO-1)] (60). The clinical hallmark of SSc is skin thickening that represents the definitive diagnostic criterion of SSc in the vast majority of cases (19–21, 61). WS patients also show SSc-like skin involvement, calcinosis and skin ulcers (62, 63). Genome-wide DNA methylation analysis conducted by Guastafierro *T et al* revealed that the methylation and mRNA level of *ITGA9* gene were altered in whole blood from WS patients (19). In particular, they demonstrated the gene *ITGA9* to be hypomethylated and overexpressed in WS diseases (19) as it had been reported in another study conducted on fibroblasts from patients with diffuse and limited SSc (61). *ITGA9* encodes for integrin  $\alpha$  9, an integral membrane glycoprotein that mediates cell–cell and cell–matrix adhesion (61). Study from Guastafierro *T et al.* (19) reported that *ADAM12*, another gene which resulted hypomethylated and overexpressed in diffuse and limited SSc (61), resulted hypomethylated and overexpressed also in WS. Of note, the Authors highlighted that the two disease shared exactly the same hypomethylated CpG in the body of *ADAM12*. *ADAM12* is another gene implicated in cell-cell and cell-matrix interactions that resulted hypomethylated and overexpressed both in WS and in diffuse and limited SSc (19, 61). *ADAM12* is involved in the process of fibrosis through enhancing Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling pathway (64, 65).

## DYSKERATOSIS CONGENITA SHARES DIFFERENTIAL METHYLATION POINT OF *PRDM8* GENE WITH WERNER SYNDROME

Dyskeratosis congenita (DKC) is a rare disease associated with impaired telomere maintenance and clinical features of premature aging due to mutation of genes required for proper telomere maintenance (e.g. *DKC1*, *TERT*, *RTEL1*, *TIN2*, *TERC*) (66, 67). WS-related epigenetic changes were compared with those occurring in DKC by exploiting a publicly available Infinium450k dataset (GEO, accession ID: GSE75310) performed on the whole blood from four DKC subjects (68). Of the 581 WS-DMPs included in the Infinium450k design, only three showed a concordant DNA methylation change in the two diseases: cg27111250, cg10129063 and cg27639662 mapping in the S\_Shore of the chr4:81109887-81110460 CpG island in the PR domain containing eight (*PRDM8*) genes (19). It resulted hypermethylated in WS patients compared to CTRs (19). This is of particular interest, as *PRDM8* is hypermethylated in DKC, aplastic anaemia (AA) (68) and Down syndrome (69), although in a different region (spanning from the CpG island chr4:81118137-81118603 to the CpG island chr4:81119095-81119391). Finally, these studies identify for the first time a genome wide DNA methylation in the peripheral blood of WS patients, emphasizing not only a genetic correlation between WS and some other disease, such as SSc, DKC or other pathologies commonly related to physiological aging, but also supporting a functional correlation between these disorders. This provides new important insight in the pathogenesis of the diseases and emphasizes the potential role of epigenetics mechanisms in WS.

### CONFLICTS OF INTEREST

None.

### REFERENCES

- Huang B, Jiang C, Zhang R. Epigenetics: the language of the cell? *Epigenomics* 2014;6:73-88.
- Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007;447:396-8.
- Ptashne M. On the use of the word 'epigenetic'. *Curr Biol* 2007;17:R233-6.
- Wang Z, Yao H, Lin S, et al. Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs. *Cancer Lett* 2012;331:1-10.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10604-9.
- Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 2012;13:97-109.
- Poulsen P, Esteller M, Vaag A, et al. The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. *Pediatr Res* 2007;61:38R-42R.
- Besingi W, Johansson A. Smoke-related DNA methylation changes in the etiology of human disease. *Hum Mol Genet* 2013;23:2290-7.
- Breitling LP, Yang R, Korn B, et al. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *Am J Hum Genet* 2011;88:450-7.
- Li Y, Tollefsbol TO. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. *Curr Med Chem* 2010;17:2141-51.
- Ronn T, Volkov P, Davegarth C, et al. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet* 2013;9:e1003572.
- Miyamura Y, Tawa R, Koizumi A, et al. Effects of energy restriction on age-associated changes of DNA methylation in mouse liver. *Mutat Res* 1993;295:63-9.
- Lee KW, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet* 2013;4:132.
- Martinez-Zamudio R, Ha HC. Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics* 2011;6:820-7.
- Caiafa P, Guastafierro T, Zampieri M. Epigenetics: poly(ADP-ribosylation) of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J* 2009;23:672-8.
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, et al. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996;10:471-80.
- Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012;13:484-92.
- Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008;9:465-76.
- Guastafierro T, Bacalini MG, Marcocchia A, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in blood cells from patients with Werner syndrome. *Clin Epigenetics* 2017;9:92.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
- Feltus FA, Lee EK, Costello JF, et al. Predicting aberrant CpG island methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12253-8.
- Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999;99:451-4.
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A, et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003;300:455.
- Jackson-Grusby L, Beard C, Possemato R, et al. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* 2001;27:31-9.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-59.
- Chen T, Hevi S, Gay F, et al. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet* 2007;39:391-6.
- Heyn H, Moran S, Esteller M. Aberrant DNA methylation profiles in the premature aging disorders Hutchinson-Gilford Progeria and Werner syndrome. *Epigenetics* 2013;8:28-33.
- Muftuoglu M, Oshima J, von Kobbe C, et al. The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis. *Hum Genet* 2008;124:369-77.
- <https://emedicine.medscape.com/article/1114125-overview>. (Ultimo accesso Marzo 2018).
- Goto M, Ishikawa Y, Sugimoto M, et al. Werner syndrome: a changing pattern of clinical manifestations in Japan (1917~2008). *Biosci Trends* 2013;7:13-22.
- Satoh M, Imai M, Sugimoto M, et al. Prevalence of Werner's syndrome heterozygotes in Japan. *Lancet*. 1999;353:1766.
- Masala MV, Scapaticci S, Olivieri C, et al. Epidemiology and clinical aspects of Werner's syndrome in North Sardinia: description of a cluster. *Eur J Dermatol*. 2007;17:213-6.

33. Oshima J, Martin GM, Hisama FM. Werner Syndrome. GeneReviews Seattle (WA), 1993.
34. Zhu X, Zhang G, Kang L, et al. Epigenetic Regulation of Werner Syndrome Gene in Age-Related Cataract. *J Ophthalmol*. 2015;579-695.
35. Rossi ML, Ghosh AK, Bohr VA. Roles of Werner syndrome protein in protection of genome integrity. *DNA Repair (Amst)* 2010;9:331-44.
36. Edwards DN, Machwe A, Chen L, et al. The DNA structure and sequence preferences of WRN underlie its function in telomeric recombination events. *Nat Commun* 2015; 6:8331.
37. Burla R, Carcuro M, Raffa GD, et al. AKTIP/Ft1, a New Shelterin-Interacting Factor Required for Telomere Maintenance. *PLoS Genet* 2015;11:e1005167.
38. Burla R, Carcuro M, Torre ML, et al. The telomeric protein AKTIP interacts with A- and B-type lamins and is involved in regulation of cellular senescence. *Open Biol* 2016; 6:160103.
39. Jovanovic SV, Clements D, MacLeod K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radic Biol Med* 1998;25:1044-8.
40. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14:R115.
41. Maierhofer A, Flunkert J, Oshima J, et al. Accelerated epigenetic aging in Werner syndrome. *Aging (Albany NY)*. 2017;9:1143-52.
42. Du P, Zhang X, Huang CC, et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics* 2010; 11:587.
43. Bacalini MG, Boattini A, Gentilini D, et al. Erratum: A meta-analysis on age-associated changes in blood DNA methylation: results from an original analysis pipeline for Infinium 450k data. *Aging (Albany NY)* 2016; 8:831.
44. Cheung HH, Liu X, Canterel-Thouennon L, et al. Telomerase protects werner syndrome lineage-specific stem cells from premature aging. *Stem Cell Reports* 2014; 2:534-46.
45. Jennemann R, Rabionet M, Gorgas K, et al. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet* 2011;21:586-608.
46. Radner FP, Marrakchi S, Kirchmeier P, et al. Mutations in CERS3 cause autosomal recessive congenital ichthyosis in humans. *PLoS Genet* 2013;9:e1003536.
47. Giacomini MF, Franca CM, Oliveira ZN, et al. Generalized morphea in a child with harlequin ichthyosis: a rare association. *Rev Bras Reumatol Engl Ed* 2016; 56:82-5.
48. Hernandez-Corbacho MJ, Jenkins RW, Clarke CJ, et al. Accumulation of long-chain glycosphingolipids during aging is prevented by caloric restriction. *PLoS One* 2011; 6:e20411.
49. Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:83-97.
50. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005;24:7410-25.
51. Adams HH, Hibar DP, Chouraki V, et al. Novel genetic loci underlying human intracranial volume identified through genome-wide association. *Nat Neurosci* 2016;19:1569-82.
52. Peltier J, O'Neill A, Schaffer DV. PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Dev Neurobiol* 2007;67:1348-61.
53. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiol (Oxf)* 2008;192:19-28.
54. Montagnana M, Lippi G, Danese E. Meccanismi epigenetici: l'esempio del Diabete Mellito tipo 1. *Biochim Clin* 2018. doi: 10.19186/BC\_2018.013
55. Bes C, Vardi S, Guven M, et al. Werner's syndrome: a quite rare disease for differential diagnosis of scleroderma. *Rheumatol Int* 2009;30:695-8.
56. Capell BC, Tlougan BE, Orlow SJ. From the rarest to the most common: insights from progeroid syndromes into skin cancer and aging. *J Invest Dermatol* 2009;129:2340-50.
57. Goto M, Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, et al. Significant elevation of IgG anti-WRN (RecQ3 RNA/DNA helicase) antibody in systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* 2006; 16:229-34.
58. Makino T, Jinnin M. Genetic and epigenetic abnormalities in systemic sclerosis. *J Dermatol* 2016;43:10-18.
59. Luckhardt TR, Thannickal VJ. Systemic sclerosis-associated fibrosis: an accelerated aging phenotype? *Curr Opin Rheumatol* 2015;27:571-6.
60. Frech T, De Domenico I, Murtaugh MA, et al. Autophagy is a key feature in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2013;34:435-9.
61. Altork N, Tsou PS, Coit P, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Ann Rheum Dis* 2014;74:1612-20.
62. Lok C, Ruto F, Labelle B, et al. Leg ulcers in Werner's syndrome. Report of one case. *J Mal Vasc* 1991;16:381-2.
63. Yeong EK, Yang CC. Chronic leg ulcers in Werner's syndrome. *Br J Plast Surg* 2004;57:86-8.
64. Atfi A, Dumont E, Colland F, et al. The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF-beta signaling through interaction with the type II receptor. *J Cell Biol* 2007;178:201-8.
65. Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, et al. Serum levels of ADAM12-S: possible association with the initiation and progression of dermal fibrosis and interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;27:747-53.
66. Coppede F. The epidemiology of premature aging and associated comorbidities. *Clin Interv Aging* 2013;8:1023-32.
67. Takemoto M, Mori S, Kuzuya M, et al. Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. *Geriatr Gerontol Int* 2012; 13:475-81.
68. Weidner CI, Lin Q, Birkhofer C, et al. DNA methylation in PRDM8 is indicative for dyskeratosis congenita. *Oncotarget* 2016;7:10765-72.
69. Bacalini MG, Gentilini D, Boattini A, et al. Identification of a DNA methylation signature in blood cells from persons with Down Syndrome. *Aging (Albany NY)*. 2015;7:82-96.

## Determinazione del perampanel plasmatico: confronto e cross-validazione tra due metodi in cromatografia liquida ad elevate prestazioni con rivelatore spettrofluorimetrico e con rivelatore a spettrometria di massa

Annachiara D'Urso<sup>1</sup>, Federica Fontana<sup>1</sup>, Ivana Gabriele<sup>1</sup>, Francesca Gilardoni<sup>1</sup>, Valentina De Riva<sup>2</sup>, Giorgia Contarato<sup>2</sup>, Federica Ranzato<sup>3</sup>, Elisabetta Galloni<sup>2</sup>, Ugo de Grazia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia

<sup>2</sup>Laboratorio di Neurobiologia, Ospedale S. Bortolo, Vicenza, Italia

<sup>3</sup>Centro Epilessia, Ospedale S. Bortolo, Vicenza, Italia

### ABSTRACT

**Determination of perampanel in plasma samples: comparison and cross-validation between two HPLC methods utilizing two different detectors: spectrofluorimetric and mass spectrometry.** Perampanel (PMP) (2-[2-oxo-1-phenyl-5-pyridin-2-yl-1,2 dihydropyridin-3-yl] benzonitrile hydrate) is a novel non-competitive selective antagonist of the postsynaptic ionotropic alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) glutamate receptor. In this study, we compared two different methods for the quantification of perampanel in human plasma: a commercially available HPLC kit with fluorescent detector and a kit for determination of 18 different anti-epileptic drugs (perampanel excluded) based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) used to implement the perampanel determination. LC-MS/MS method was fully validated according to available guidelines: calibration curves were linear across perampanel concentration range of 2,5-2,800 ng/mL with correlation coefficient >0,99. Accuracy and precision results were in accordance with acceptance criteria ( $\pm 15\%$ ). Data collected from 95 patients, treated with perampanel as maintenance antiepileptic therapy, show a very strong correlation between the two methods. Perampanel plasma concentrations in patient samples at steady state, determined with the LC-MS/MS method, ranged from 35 to 985 ng/mL and are in line with previously reported data.

### INTRODUZIONE

Il perampanel è un antagonista non competitivo selettivo del recettore post-sinaptico ionotropico AMPA (acido-ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazol-propionico) del glutammato (1). Alcuni studi evidenziano che gli antagonisti del recettore AMPA possono indurre una ridotta iperstimolazione ed effetti anticonvulsivanti, oltre che un'inibizione della generazione e della ampiezza delle crisi epilettiche. Inoltre, gli antagonisti del recettore AMPA possono prevenire la morte neuronale (2). Il perampanel ha un meccanismo d'azione unico tra i farmaci antiepilettici (AED): gli AED in generale hanno come target i vari recettori deputati a ridurre l'eccitabilità neuronale e a controllare le convulsioni, diminuendo così il rischio di danni e morte correlate ad esse (3). L'Agenzia europea dei medicinali (EMA) e la "Food and Drug Administration" (FDA) hanno approvato il perampanel (Fycompa, Eisai, Giappone) nell'ottobre 2012 come farmaco aggiuntivo per il trattamento delle

crisi epilettiche parziali con o senza generalizzazione secondaria per pazienti di almeno 12 anni di età. Nel 2015 è stato approvato l'uso del perampanel anche per crisi epilettiche tonico-cloniche generalizzate primarie in pazienti con epilessia di almeno 12 anni di età (4). Il trattamento inizia con una dose da 2 mg assunta prima di coricarsi che viene aumentata gradualmente in base alla risposta clinica. L'intervallo di dosaggio raccomandato per i pazienti con crisi parziali in assenza di altri AED inducenti è da 8 mg a 12 mg (assunti prima di coricarsi), mentre nei pazienti con crisi tonico-cloniche generalizzate primarie la dose di mantenimento raccomandata è di 8 mg assunta prima di coricarsi. Gli eventi avversi sono solitamente di severità lieve o moderata e più frequentemente riguardano il sistema nervoso centrale, come vertigini, sonnolenza, mal di testa e stanchezza. La somministrazione di perampanel è seguita da un rapido e completo assorbimento. Il tempo medio di raggiungimento del picco di concentrazione massima varia da 0,5 a 2,5 ore a digiuno

Corrispondenza a: Annachiara D'Urso, U.O. Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Via Celoria 11, 20133 Milano. Tel. 022394-2247 -2455, Fax 0223942535, E-mail annachiara.durso@istituto-besta.it

Ricevuto: 11.01.2018

Revisionato: 26.01.2018

Accettato: 18.05.2018

Pubblicato on-line: 18.07.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.042

(da 2 a 3 ore a stomaco pieno). Il perampanel è sostanzialmente legato alle proteine (95-96%) e solo il 5% è libero e disponibile ad esercitare l'effetto farmacologico (5, 6). Il perampanel è metabolizzato per ossidazione, seguita da glucuronazione mediata da citocromo P450 (CYP) 3A4/5, CYP1A2 e CYP2B6 (1). L'emivita del perampanel è approssimativamente 105 ore in pazienti che non assumono concomitanti AED inducenti. In queste condizioni, lo stato stazionario viene raggiunto in 2 o 3 settimane. L'eliminazione dei metaboliti avviene attraverso le urine e le feci. Circa il 2% della dose viene escreta nelle urine immodificata.

Il monitoraggio terapeutico dei farmaci (TDM) può aiutare ad ottimizzare la dose degli antiepilettici. Al momento sono disponibili informazioni limitate sull'utilità clinica del TDM del perampanel. Dato che l'intervallo terapeutico deve essere fissato per ogni paziente, il monitoraggio deve essere eseguito per l'aggiustamento della dose e il controllo della compliance del paziente, specialmente in caso di insuccesso del trattamento farmacologico (7-9).

In questo studio abbiamo confrontato due diversi metodi per la quantificazione del perampanel in plasma o siero umano: un kit commerciale per HPLC con rivelatore a fluorescenza, già in uso nei nostri laboratori (10) e un kit per la determinazione di 18 differenti AED (11) basato su cromatografia liquida interfacciata al separatore di massa accoppiata (LC-MS/MS) all'interno del quale abbiamo implementato la determinazione del perampanel (12-14).

## MATERIALI E METODI

### Campioni

95 campioni di sangue sono stati raccolti in provette contenenti litio-eparina da pazienti che assumono perampanel come terapia antiepilettica di mantenimento e che si sono recati presso la Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano e l'Ospedale S. Bortolo di Vicenza, per TDM. Tutti i pazienti erano a digiuno di farmaco da almeno 8 ore e assumevano il farmaco in monodose come prescritto. I campioni sono stati centrifugati a 2000g per 10 minuti e il plasma separato è stato distribuito in due aliquote conservate a -20 °C fino al momento dell'analisi o inviato a temperatura controllata. I campioni sono stati quindi scambiati tra il laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica della Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta e il laboratorio di Neurobiologia dell'Ospedale S. Bortolo, per confrontare i risultati. In questo studio sono stati inclusi anche campioni commerciali dal programma di VEQ (LGC standard, UK). Per questo studio sono stati impiegati campioni residui ed anonimizzati e lo studio è stato condotto rispettando la dichiarazione di Helsinki del 1975.

### Materiali

I reagenti ed i kit usati in questo studio sono stati gentilmente offerti da EurekaOne, e comprendono il kit

per misurare il perampanel con HPLC a fluorescenza (Z79210-Perampanel-FAST, EurekaOne – Chiaravalle, Italia) ed il kit per la determinazione di 18 differenti AEDs tramite LC-MS/MS (LC05010-Antiepilettici plasmatici in LC-MS – Standard interni deuterati, EurekaOne – Chiaravalle, Italia). Entrambi i kit sono certificati CE e sviluppati secondo le linee guida FDA per la produzione industriale ["Food and Drug Administration Guidance for Industry" (FDA-GFI)]. Il kit per la quantificazione del perampanel in HPLC con rivelatore a fluorescenza è costituito da: una soluzione di perampanel in metanolo a concentrazione nota (reagente C), utilizzata nella procedura preanalitica per validare il tempo di ritenzione; un calibratore per perampanel plasmatico (800 ng/mL); due controlli interni (CQ-1, 100 ng/mL e CQ-2, 1500 ng/mL); un deproteinizzante organico con standard interno (reagente A) e una soluzione stabilizzante (reagente B). Lo standard interno è coperto da brevetto. Il kit contiene anche la fase mobile pronta all'uso (reagente M).

Il kit per l'analisi mediante LC-MS/MS contiene, oltre a calibratori e controlli, la fase mobile M1 acquosa, la fase mobile M2 organica, e la soluzione precipitante organica contenente sei standard interni deuterati (levetiracetam-D6, lacosamide-D3, felbamato-D4, zonisamide-D4, etosuccimide-D3, N-desmetilsuccimide-D5).

Il perampanel puro è stato gentilmente offerto da EISAI Co Ltd (Giappone).

La curva di calibrazione a 7 punti (0, 50, 200, 500, 800, 1300, 2000 ng/mL) e due livelli di controllo di qualità in matrice (CQ-2, 280 ng/mL; CQ-4, 1600 ng/mL) sono stati preparati dal fornitore mediante l'aggiunta di perampanel ai calibratori e controlli presenti nel kit commerciale.

Per soddisfare i criteri di validazione EMA relativi al numero e al posizionamento dei controlli di qualità, sono stati aggiunti tre ulteriori campioni pari a 7,5 ng/mL (CQ-1), a 900 ng/mL (CQ-3) e il limite di quantificazione più alto (ULOQ) pari a 2800 ng/mL.

### Trattamento dei campioni

Per l'analisi in HPLC, i campioni vengono trattati come segue: 100 µL di campione, calibratori e controlli vengono dispensati in provette coniche con tappo da 1,5 mL; a questi vengono aggiunti 300 µL di reagente A, la miscela viene agitata mediante vortex per almeno 10 secondi e centrifugata a 14000 g per 10 minuti; 100µL del sovrantante limpido vengono trasferiti in una provetta di vetro per cromatografia a cui si aggiungono 300 µL di reagente B. 5 µL del campione così preparato vengono iniettati nel cromatografo a 25 °C. Il campione così preparato è stabile per 2 giorni a 2-8 °C.

I campioni da analizzare con il metodo LC-MS/MS sono stati preparati dispensando 50 µL di ogni campione (campione, calibratori, controlli) in una microprovetta da 1,5 mL a cui si aggiungono 500 µL di soluzione deproteinizzante contenente lo standard interno. Segue agitazione mediante vortex per 20 secondi alla massima

velocità e una centrifugazione di 15 minuti a 15000g. 50  $\mu$ L del sopranatante sono trasferiti in una provetta di vetro per cromatografia contenente 450  $\mu$ L di fase mobile M1. In seguito ad ulteriore agitazione mediante vortex, 5  $\mu$ L di questa soluzione vengono iniettati nell'apparato cromatografico mediante autocampionatore, dove sono conservati alla temperatura controllata di 10 °C.

### Condizioni analitiche per HPLC

L'apparecchio per l'HPLC a fluorescenza è costituito da un autocampionatore Gilson (Gilson Autoinjector 234) con un loop da 20  $\mu$ L (Gilson, Villiers-le-Bell, Francia) e una pompa Shimadzu LC-20AD (Shimadzu Italia, Milano, Italia). Sul sistema è stata installata una colonna Poroshell 120 (EC-C18 4.6x50 mm, 2.7  $\mu$ m, Agilent Technologies, USA). Il rivelatore utilizzato è a fluorescenza RF-551 (Shimadzu Italia, Milano, Italia) con lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione a 290 e 430 nm. La fase mobile viene fatta passare attraverso la colonna con eluizione isocratica al flusso di 1 mL/min. Il tempo di ritenzione del perampanel e dello standard interno sono rispettivamente 4,4 min e 2,3 min (10).

### Condizioni analitiche per LC-MS/MS

Il saggio LC-MS/MS è stato condotto su uno spettrometro di massa tandem "Thermo Scientific" composto da un sistema HPLC Trascend TLX-1 e uno spettrometro di massa TSQ "Quantum Access Mass" (Thermo Scientific, Milano, Italia). Per la separazione cromatografica è stata usata una colonna C18 Hypersil Gold (50x2,1 mm, 1,9  $\mu$ m particle Thermo-Fisher).

L'analisi dei dati è effettuata dal software Thermo Scientific Xcalibur.

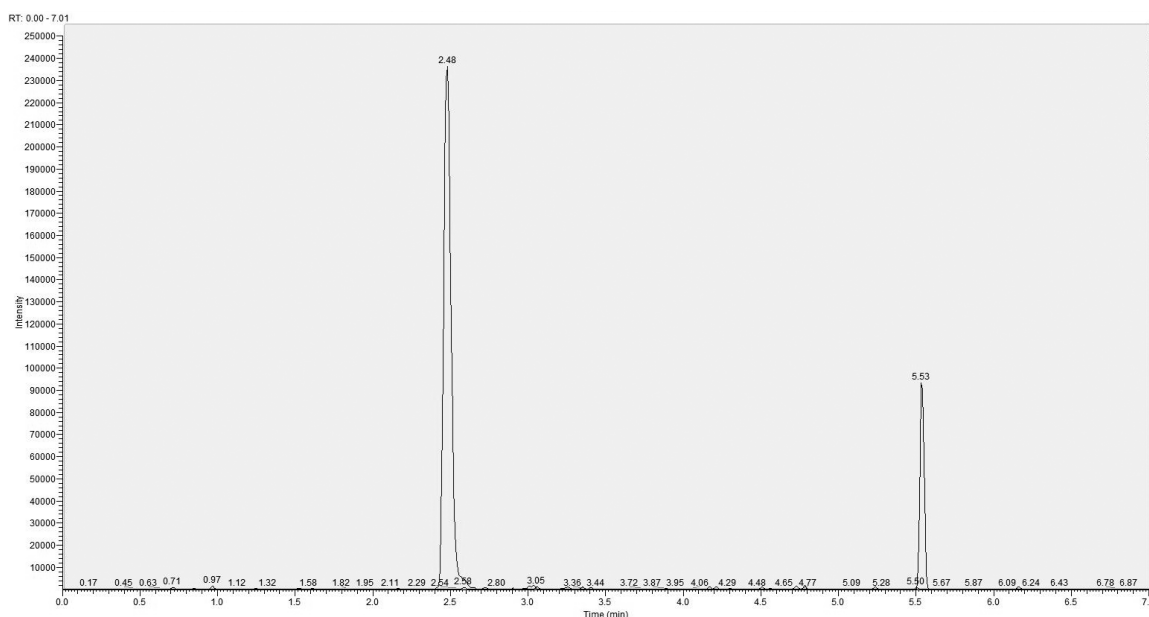
Le due fasi mobili fornite (una prevalentemente acquosa, M1, l'altra prevalentemente organica, M2) vengono fatte passare attraverso la colonna a diversi flussi: i tempi di ritenzione del perampanel e del levetiracetam-D6 (standard interno - SI) sono rispettivamente 5,5 min e 2,5 min (Figura 1).

Lo spettrometro di massa è fornito di sorgente di ionizzazione electrospray riscaldata (Heated Electrospray Source Ionization, H-ESI). L'analita e lo standard interno sono stati identificati tramite "multiple reaction monitoring" (MRM) secondo le seguenti transizioni: 350,1 $\rightarrow$ 104,2 (qualificatore), 350,1 $\rightarrow$ 219,1 (qualificatore), 350,1 $\rightarrow$ 247,1 (quantificatore), per il perampanel; 177,1 $\rightarrow$ 132,2 (quantificatore) per il levetiracetam-D6. I parametri dello spettrometro per ione precursore e prodotto sono stati ottimizzati come riportato nella Tabella 1. I dati sono stati acquisiti in modalità "selective reaction monitoring" (SRM) con tempo di ciclo pari a 0,4 secondi.

### Cross-validazione

Il metodo LC-MS/MS è stato completamente validato secondo le linee guida EMA (15) e SIBioC (16), mentre l'efficienza di processo e l'effetto matrice sono stati valutati in accordo con Matuszewski BK et al. (17) e De Nicolò A et al. (18), rispettivamente.

I parametri di validazione includono specificità, linearità, "carry-over", limite inferiore di quantificazione (LLOQ), esattezza e precisione entro e tra le serie, recupero, effetto matrice, efficienza di processo, integrità



**Figura 1**

*Cromatogramma esemplificativo: perampanel (Calibratore1=50 ng/mL), tempo di ritenzione = 5,5 minuti; standard interno (levetiracetam-D6), tempo di ritenzione = 2,5 minuti.*

**Tabella 1***Parametri dell'apparato LC-MS/MS*

Analita	ione precursore (m/z)	ione prodotto (m/z)	Polarità	Energia di collisione (Volts)	Tube Lens (Volts)
Perampanel	350,1	104,2 qualificatore	+	34	88
		219,1 qualificatore	+	33	88
		247,1 quantificatore	+	24	88
Levetiracetam-D6	177,1	132,2 quantificatore	+	14	50

di diluizione, ri-analisi dei campioni clinici e stabilità.

La riproducibilità entro e tra le serie è stata esaminata valutando esattezza (bias%) e precisione (CV%) utilizzando LLOQ (pari a 2,5 ng/mL), quattro campioni di CQ (CQ-1 = 7,5 ng/mL; CQ-2 = 280 ng/mL; CQ-3 = 900 ng/mL; CQ-4 = 1600 ng/mL) e ULOQ pari a 2800 ng/mL con cinque replicati per concentrazione in una singola analisi e tre replicati per concentrazione in tre analisi.

Per confermare la validità del metodo HPLC sono stati misurati esattezza e precisione dei CQI entro e tra le serie.

Il recupero, l'effetto matrice e l'efficienza del processo sono stati valutati utilizzando sei diversi campioni di plasma umano privo di analita. Il recupero (RE) di perampanel dal plasma umano è stato misurato comparando la risposta dell'analita inserito in sei campioni privi dell'analita prima dell'estrazione alle concentrazioni di CQ-1 e CQ-4, con la risposta dell'analita pulito alle medesime concentrazioni secondo la seguente formula:

$$RE = \left( \frac{\text{risposta del perampanel in campione bianco (processato)}}{\text{risposta del perampanel puro (non processato)}} \right) * 100$$

L'effetto matrice (ME) è stato investigato confrontando l'area dell'analita in solvente con l'area dell'analita in sei diversi campioni privi dell'analita, aggiunto dopo completa estrazione alle concentrazioni di CQ-1 e CQ-4 (16). ME è stato ulteriormente misurato come effetto matrice normalizzato per lo standard interno (IS-nME) secondo la formula (18):

$$IS-nME = \left[ \left( \frac{\text{area del perampanel in matrice} / \text{area dell'IS in matrice}}{\text{area del perampanel in solvente} / \text{area dell'IS in solvente}} \right) \right] * 100$$

Per valutare l'integrità di diluizione, il CQ di perampanel pari a 2800 ng/mL (ULOQ) è stato diluito 1:2, v/v con plasma umano privo di farmaci, quindi estratto e analizzato in cinque replicati, ricavando quindi i valori di bias e precisione.

La ri-analisi di campioni clinici (15,16) è stata eseguita su 39 campioni di pazienti. I campioni sono stati analizzati in due diverse sessioni analitiche; la differenza percentuale è calcolata con la seguente formula:

$$\left( \frac{\text{risultato ripetuto} - \text{risultato iniziale}}{\text{media dei risultati}} \right) * 100$$

e dovrebbe essere compresa entro il 20% in almeno il 67% delle ripetizioni come richiesto dalla linea guida.

### Metodi statistici

I due metodi sono stati confrontati con la regressione di "Passing-Bablok" e con l'analisi "Bland-Altman"; il test di D'Agostino-Pearson e il test di Grubbs sono stati utilizzati per verificare la distribuzione delle concentrazioni nella popolazione e la presenza di "outliers" rispettivamente. I software statistici utilizzati sono MedCalc Statistical Software versione 17.2 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgio) e MetComp Software versione 1 (GdS SIBioC, Novara, Italia) (19).

## RISULTATI

### Metodo HPLC

Esattezza e precisione relative ai 2 livelli di CQ (100 e 1500 ng/mL) sono state valutate entro e tra le serie. Le medie dei risultati ottenuti mostrano un errore relativo medio compreso tra 5,4% e 7,8%. La curva di calibrazione è risultata lineare nell'intervallo di concentrazione da 10 a 800 ng/mL con valori di esattezza entro i limiti stabiliti dalle linee guida (15,16). Il recupero del perampanel dal plasma umano è stato 98.1±1.3% per la concentrazione bassa e 98.3±1.4% per la concentrazione alta.

### Metodo LC-MS/MS

La separazione cromatografica presenta un'elevata specificità e sensibilità. I picchi sono simmetrici e ben separati (Figura 1), non è stata rilevata la presenza di

interferenti in un pool di plasmi da donatori volontari (n=6). I farmaci antiepilettici (possibili interferenti analitici) considerati in questo studio e presenti nei calibratori e nei controlli, sono: carbamazepina e il suo metabolita carbamazepina-epossido, oxcarbazepina e relativo metabolita attivo 10-OH-monoidrossicarbamazepina, dintoina, fenobarbitale, primidone, topiramato, lamotrigina, levetiracetam, felbamato, zonisamide, rufinamide, lacosamide, e acido valproico.

Il limite minimo rilevabile (Limit Of Detection, LOD) è stato misurato pari 0,6 ng/mL.

La curva di calibrazione a sette punti è risultata lineare ( $y = 0,0785 (\pm 0,4975) + 0,0208 (\pm 0,0017)x$ ,  $r^2 = 0,9979 \pm 0,0014$ , n=6) nell'intervallo di concentrazione da 2,5 a 2800 ng/mL.

L'iniezione di campioni di plasma umano privi di farmaco (n=6) dopo ULOQ non ha mostrato alcun segnale >20% di LLOQ al tempo di ritenzione del perampanel, o >5% al tempo di ritenzione dello standard interno. L'effetto carry-over è stato quindi escluso sia per il perampanel sia per il levetiracetam-D6.

I risultati relativi a precisione ed esattezza entro e tra le serie sono riportati nella Tabella 2: a tutte le concentrazioni considerate il bias e il CV sono compresi entro il  $\pm 15\%$ .

Il recupero medio per le concentrazioni CQ-1 e CQ-4, è risultato entro i criteri di accettazione (90-110%).

Il valore medio di ME e di IS-nME sono risultati entro il  $\pm 15\%$  ad entrambe le concentrazioni prese in esame. I risultati relativi a ME e IS-nME sono riassunti nella Tabella 3.

**Tabella 2**  
Precisione ed esattezza del metodo LC-MS/MS

	Campioni	Valore atteso (ng/mL)	Media (DS) (ng/mL)	CV, %	Bias, %
Entro le serie	LLOQ	2,5	2,5 (0,3)	11,7	-2,0
	CQ-1	7,5	7,7 (0,7)	9,2	2,4
	CQ-2	280,0	285,5 (14,1)	4,9	2,0
	CQ-3	900,0	903,9 (18,2)	2,0	0,4
	CQ-4	1600,0	1624,6 (179,6)	11,1	1,5
	ULOQ	2800	2879,3 (132,8)	4,6	2,8
Tra le serie	LLOQ	2,5	2,6 (0,3)	12,2	2,5
	CQ-1	7,5	8,1 (0,9)	11,4	8,6
	CQ-2	280	291,8 (21,3)	7,3	4,2
	CQ-3	900	911,0 (26,4)	2,9	1,2
	CQ-4	1600	1554,6 (192,1)	12,4	-2,5
	ULOQ	2800	2797,3 (85,7)	3,1	-0,1

LLOQ, limite inferiore di quantificazione; CQ, controllo di qualità; ULOQ, limite superiore di quantificazione.

**Tabella 3**  
Metodo LC-MS/MS. Risultati relativi a recupero, effetto matrice ed effetto matrice normalizzato per lo standard interno

	RE, %		ME, %		IS-nME, %	
	CQ-1	CQ-4	CQ-1	CQ-4	CQ-1	CQ-4
campione 1	98,3	93,5	-0,7	-9,1	-1,6	-0,9
campione 2	96,6	106,8	4,1	-16,5	-3,8	0,7
campione 3	107,8	101,5	0,5	-1,3	3,7	1,3
campione 4	96,3	102,5	4,9	-1,3	-4,2	7,6
campione 5	93,7	108,5	11,8	-4,0	-2,1	-4,6
campione 6	94,0	108,5	-1,4	-2,7	-2,1	0,3
Media (DS)	97,8 (5,2)	103,6 (5,8)	3,2 (4,9)	-5,8 (6,0)	-1,7 (2,8)	0,7 (4,0)

RE, recupero; ME, effetto matrice; IS-nME, effetto matrice normalizzato per lo standard interno; CQ, controllo di qualità.

L'efficienza del processo è stata stimata pari a  $99,4 \pm 5,4\%$  per il CQ-1 ed a  $103,2 \pm 9,4\%$  per il CQ-4 (17).

La precisione e l'esattezza derivate dalla diluizione dei campioni erano entrambe comprese entro il  $\pm 15\%$ : il bias pari a  $0,3\%$  e CV pari  $3,3\%$ .

Il test di ri-analisi dei campioni clinici ha rilevato una differenza percentuale inferiore al  $20\%$  in 35 campioni su 39 (e quindi in circa il  $90\%$  dei casi).

I campioni estratti sono stabili per almeno 7 giorni a  $4-10^\circ\text{C}$  (temperatura frigorifero - temperatura dell'auto-campionatore) e per 4 settimane a  $-20^\circ\text{C}$ . Inoltre studi di stabilità a lungo termine hanno mostrato che i campioni di plasma umano ( $n=13$ ), contenenti perampanel, conservati a  $-20^\circ\text{C}$ , dopo un ciclo di congelamento-scongelo, sono stabili fino 24 mesi con una differenza % massima rispetto alla prima misurazione pari al  $-11,9\%$ .

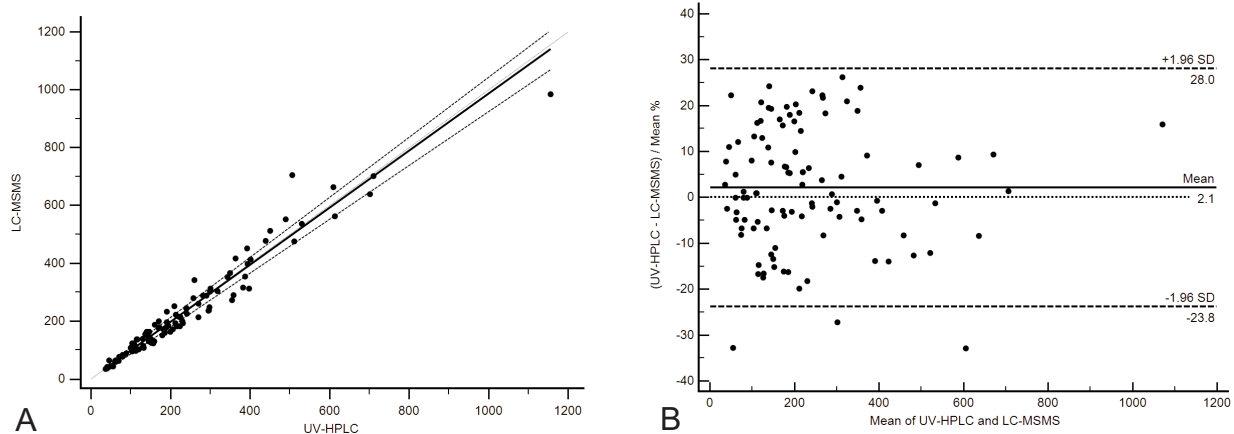
### Confronto tra metodi

La cross-validazione è stata eseguita considerando il metodo basato sull'HPLC a fluorescenza come metodo di riferimento e il metodo LC-MS/MS come saggio da testare (19). Sia il test HPLC che il saggio LC-MS/MS sono stati in grado di identificare campioni privi di perampanel. La prestazione analitica del saggio è stata valutata mediante l'uso di campioni di pazienti ( $n=95$ ), e i risultati sono stati riportati nel grafico di regressione di Figura 2A. La retta di regressione ha mostrato un'intercetta di  $0,4667$  [intervallo di confidenza (IC)  $95\%$   $-6,0 - 6,3256$ ] e una pendenza di  $0,9867$  (IC  $95\%$   $0,9302 - 1,0375$ ). Non è stata rilevata una deviazione significativa dalla linearità ( $P=0,86$ ). Il coefficiente di correlazione è pari a  $0,98$  con un IC  $95\%$   $0,970 - 0,986$  con  $P < 0,0001$ . L'analisi "Bland-Altman" (Figura 2B) ha mostrato una concordanza molto buona con un bias non significativo ( $2,09\%$ , IC  $95\%$   $-0,498 - 4,677$ ) con il  $95\%$

delle differenze tra metodo LC-MS/MS e metodo HPLC nell'intervallo  $-23,862 - 28,041$ . Le concentrazioni di perampanel nella popolazione studiata, analizzate mediante LC-MS/MS, variavano da un minimo di  $35$  ad un massimo di  $985$  ng/mL (media  $231,4$ , mediana  $184,0$  ng/mL). I dati riportati nella Tabella 4 e Tabella 5 descrivono le caratteristiche della popolazione esaminata. I test statistici hanno permesso di verificare la normalità della distribuzione delle concentrazioni nella popolazione e di escludere la presenza di outliers. Non sono state trovate differenze significative nella concentrazione plasmatica di perampanel in base al sesso o all'età.

### DISCUSSIONE

Il metodo LC-MS/MS sviluppato nel corso di questo studio per la quantificazione del perampanel nel plasma umano è stato completamente validato e mostra sensibilità, linearità, precisione ed esattezza all'interno dei criteri di accettabilità definiti dalle linee guida (15,16). Il metodo è inoltre caratterizzato da buon recupero e stabilità, l'effetto matrice è stato ampiamente investigato ed escluso. Il metodo è rapido, in quanto permette l'analisi del campione in 10 minuti, e semplice, perché si basa su una semplice precipitazione proteica, utilizzando un volume di campione inferiore rispetto a metodi pubblicati in precedenza ( $50\ \mu\text{L}$  invece di  $100\ \mu\text{L}$ ) (13,14). Recentemente è stato pubblicato un nuovo metodo in HPLC con rilevatore in fluorescenza (20), altrettanto semplice e veloce, per l'estrazione e quantificazione del perampanel in campioni di plasma umano: rispetto al nostro metodo, l'intervallo di calibrazione risulta meno esteso ( $20-1000$  ng/mL) e limitato alla misurazione del solo perampanel e nessun altro farmaco antiepilettico co-somministrato. Il metodo LC-MS/MS che abbiamo sviluppato risulta il primo in



**Figura 2**

Correlazione tra i due metodi analitici. Pannello A: grafico di regressione di Passing-Bablok: la linea punteggiata rappresenta l'identità con pendenza =1, la linea continua rappresenta la linea di regressione e le linee tratteggiate rappresentano il  $95\%$  dell'intervallo di confidenza. Pannello B, grafico di Bland-Altman: la linea punteggiata indica lo  $0\%$  di differenza tra i valori misurati; la linea solida indica la differenza percentuale media misurata e le linee tratteggiate rappresentano il  $95\%$  dei limiti di concordanza.

**Tabella 4**

Descrizione della popolazione studiata

Sesso, n (%)	
Femmine	49 (52%)
Maschi	46 (48%)
Età in anni; mediana (intervallo)	
	34,9 (13,0-67,0)
Peso in kg; mediana (intervallo)	
	68,8 (38,0-112,0)
Concentrazione plasmatica di perampanel (ng/mL)	
Media (DS)	231,4 (165,8)
Mediana (intervallo)	184,0 (35,0-985,0)

grado di determinare simultaneamente le concentrazioni di perampanel e di altri farmaci antiepilettici in campioni clinici con un intervallo di linearità adeguato (2,5-2800 ng/mL), considerando che i valori di riferimento suggeriti per la concentrazione plasmatica del farmaco variano da 180 a 980 ng/mL (9). Rispetto al metodo proposto da Mano Y. (21), si può rilevare che il metodo da noi proposto, presenta un intervallo di linearità più esteso, con un LLOQ più elevato (2,5 ng/mL contro 0,25 ng/mL), ma tuttavia adatto per la misurazione di concentrazioni di perampanel clinicamente utili.

La comparazione con il metodo in HPLC in uso mostra l'elevata correlazione tra i due metodi. I nostri dati sui campioni di pazienti confermano gli studi precedenti sulla dose e sui rapporti di concentrazione, e nessun effetto da variabili come il sesso e l'età (22).

Il metodo LC-MS/MS quindi, per la sua semplicità di esecuzione, sensibilità e correlazione con il metodo in uso si presta all'introduzione nella pratica clinica di laboratorio.

## RINGRAZIAMENTI

Gli Autori desiderano ringraziare ringraziare: EISAI Co Ltd per averci donato il farmaco perampanel puro necessario per eseguire questo studio; EurekaOne Lab Division per averci fornito i kit e l'assistenza tecnica necessarie.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Greenwood J, Valdes J. Perampanel (Fycompa) A review of clinical efficacy and safety in epilepsy. P T. 2016;41:683-98.
- Franco V, Crema F, Iudice A, et al. Novel treatment options for epilepsy: focus on perampanel. Pharmacol Res 2013;70:35-40.
- Bush MA, Franco S. QuickStats: age-adjusted percentages of adults aged ≥18 years who have epilepsy,

**Tabella 5**

Concentrazione media di Perampanel per gruppi di dosaggio terapeutico

Posologia	N° Pazienti arruolati	Concentrazione di Perampanel ng/mL, media (DS)
2 mg/die	8	172,1(123,7)
4 mg/die	35	188,5 (127,5)
6 mg/die	20	305,0 (188,5)
8 mg/die	23	244,3 (141,4)
10 mg/die	9	305,1 (264,6)

- by epilepsy status and race/ethnicity-National Health Interview Survey, United States, 2010 and 2013 combined. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2016;65:611
- Fycompa (perampanel) prescribing information. ([https://www.fycompa.com/-/media/Files/Fycompa/Fycompa\\_Prescribing\\_Information.pdf](https://www.fycompa.com/-/media/Files/Fycompa/Fycompa_Prescribing_Information.pdf)). Woodcliff Lake, New Jersey: Eisai R&D Management (Eisai Ltd.) 2016. (Ultimo accesso: maggio 2017).
- Fycompa USPI. Perampanel (Fycompa) US prescribing information ([https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/202834lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/202834lbl.pdf)). (Ultimo accesso: maggio 2017)
- Fycompa SPC. Perampanel (Fycompa). Summary of product characteristics (Aggiornato il 13 novembre 2013). (Ultimo accesso: maggio 2017)
- Gidal BE, Ferry J, Majid O, et al. Concentration-effect relationships with perampanel in patients with pharmacoresistant partial-onset seizures. Epilepsia 2013;54:1490-7.
- Patsalos PN. The clinical pharmacology profile of the new antiepileptic drug perampanel: A novel noncompetitive AMPA receptor antagonist. Epilepsia 2015;56:12-27.
- Patsalos PN, Coughoulaki M, Sander JW. Perampanel serum concentration in adult with epilepsy: effect of dose, age, gender and concomitant antiepileptic drugs. Ther Drug Monit 2016;38:358-64.
- Galloni E, De Riva V, Rigon M et al. Determinazione della concentrazione plasmatica di perampanel, Proceeding of 22 annual Symposium of European Ligand Assay Society ELAS. Ligand Assay 2016;21:293.
- D'Urso A, Coniglione V, Brambilla S et al. A brief summary of four-year's experience with a simply, accurate, sensitive, ready to use kit for simultaneous TDM of 16 AEDs in serum and plasma by LC-MS/MS, Atti del congresso MSACL-EU 2016, Salisburgo (Austria) 10-12 settembre 2016; 78. Poster B1.
- D'Urso A, de Grazia U, Fontana F et al. Therapeutic Drug Monitoring of Perampanel in human samples: A novel LCMS/MS assay compared with a fluorescent HPLC assay, Proceeding of 49° Congresso Società Italiana di Biochimica Clinica SIBioC, Firenze (Italy) 16-18 ottobre 2017, Biochim Clin 2017;41(SS2):S96
- Mano Y, Takenaka O, Kusano K. HPLC with fluorescence detection assay of perampanel, a novel AMPA receptor antagonist, in human plasma for clinical pharmacokinetic studies. Biomed Chromatogr 2015;10:1589-93.
- Mano Y, Takenaka O, Kusano K. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for

- the determination of perampanel, a novel  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor antagonist in human plasma. *J Pharm Biomed. Anal.* 2015;107: 56-62.
15. EMEA/CHMP/EWP, Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, 2011. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf) (Ultimo accesso: maggio 2018).
  16. D'Avolio A, Cantù M, Gervasoni J et al. Validazione dei metodi quantitativi bioanalitici in spettrometria di massa: regole e protocolli sperimentali. *Biochim Clin* 2018;42:51-61.
  17. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003;75:3019-30.
  18. De Nicolò A, Cantù M, D'Avolio A. Matrix effect management in liquid chromatography mass spectrometry: the internal standard normalized matrix effect. *Bioanalysis* 2017;14:1093-105.
  19. Vidali M, Tronchin M, Dittadi R. Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:129-42.
  20. Mohamed S, Candela C, Riva R et al. Simple and rapid validated HPLC-fluorescence determination of perampanel in the plasma of patients with epilepsy. *Pract Lab Med* 2018;10:15-20.
  21. Mano Y, An inter-laboratory cross-validation study for determination of perampanel in human plasma by liquid chromatography assays. *Biomed Chromatogr.* 2016;30:2067-9.
  22. Gidal BE, Majid O, Ferry J et al. The practical impact of altered dosing on perampanel plasma concentrations: pharmacokinetic modeling from clinical studies. *Epilepsy Behav.* 2014;35:6-12.

## L'ormone anti-Mülleriano come marcatore di scarsa risposta alla stimolazione ovarica

Elisa Ciulla<sup>1</sup>, Angela M. D. Boria<sup>1</sup>, Shanti L. Levi<sup>2</sup>, Anna Ottolenghi<sup>1</sup>, Tullio Pescatori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio e <sup>2</sup>Centro di Endocrinologia-Sterilità-Procreazione Medico Assistita, Presidio Ospedaliero Macedonio Melloni, Milano

### ABSTRACT

**Anti-Müllerian hormone as marker for poor response to ovarian stimulation.** Individualised protocols of controlled ovarian stimulation in assisted reproductive technologies (ART) based on the prediction of ovarian response, increase positive results, reduce the cycle cancelation risk and costs related to ineffective treatments. Recently it has been observed that anti-Müllerian hormone (AMH), a marker for ovarian reserve, is also a reliable index of ovarian response and therefore could be utilised to establish personalized treatments in ART. The aim of this study is to evaluate the usefulness of serum AMH levels as marker of ovarian response to stimulation. The study involved 145 women, who attended the clinical laboratory of Presidio Ospedaliero Macedonio Melloni in Milan (Italy), for a number of preliminary tests required by the fertility centre of the same hospital before undergoing ovarian stimulation. According to the obtained results, the AMH value correlates with the ovarian response better than age and follicle-stimulating hormone (FSH) concentration. We also investigated the ability of AMH concentration in discriminating between poor and normal responsive patients. We compared the results with those obtained from age and other ovarian reserve markers; AMH showed a capacity to identify poor-responsive patients similar to the one showed by the antral follicle count and superior to those of age and FSH serum concentration. In conclusion, the determination of serum AMH to establish individualised ovarian stimulation protocols, could be recommended in order to reduce the cycle cancelation risk because of poor-response, to decrease costs and the psychological stress experienced by patients in case of failure of the procedure.

### INTRODUZIONE

L'ormone anti-Mülleriano (AMH) è una glicoproteina dimerica di 140 kDa che appartiene alla famiglia dei "transforming growth factor  $\beta$ " (1) e svolge un ruolo importante nella fisiologia ovarica. È prodotto esclusivamente nelle gonadi dalle cellule della granulosa che rivestono i follicoli primari e pre-antrali; è inoltre espresso in minor quantità nei follicoli antrali finché non raggiungono la grandezza e lo stadio differenziativo in cui sono selezionati per la dominanza sotto l'azione dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) (1). Il ruolo fisiologico principale di AMH è quello di inibire il reclutamento dei follicoli primari dal restante pool di follicoli primordiali (2). AMH non interviene nel successivo reclutamento ciclico di una coorte limitata di follicoli antrali; tale processo è guidato da un aumento del FSH sierico con conseguente selezione e sviluppo del follicolo dominante. È stato dimostrato che AMH

riduce la sensibilità dei follicoli antrali di 2-7 mm di diametro nei confronti di FSH (3). AMH è inoltre un co-regolatore della steroidogenesi. L'espressione dell'aromatasi CYP19a1, enzima chiave nella biosintesi degli estrogeni, viene indotta da FSH e inibita direttamente da AMH. Grazie ad AMH quindi, i piccoli follicoli antrali producono poco estradiolo prima di essere selezionati (3, 4).

La determinazione di AMH sierico nelle donne viene richiesta principalmente per la valutazione della riserva ovarica, rappresentata dalla quantità di follicoli primordiali presenti nelle ovaie al momento della valutazione. Nelle procedure di procreazione medicalmente assistita (PMA), la corretta valutazione della riserva ovarica è di fondamentale importanza per garantire una consulenza mirata alla coppia. Il declino della fertilità femminile con il progredire dell'età, causato dalla riduzione del pool follicolare e della qualità ovocitaria, è un processo fisiologico ampiamente

Correspondence to: Elisa Ciulla, ASST Fatebenefratelli-Sacco di Milano, Presidio Ospedaliero Macedonio Melloni, via M. Melloni 52, 20129 Milano. Tel. 0263633364, E-mail: elisa.ciulla@asst-fbf-sacco.it

Ricevuto: 10.02.2018

Revisionato: 03.05.2018

Accettato: 07.05.2018

Pubblicato on-line: 06.06.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.035

dimostrato. Esiste comunque una grande variabilità inter-individuale relativa all'età nella quale le donne possono andare incontro ad esaurimento della riserva ovarica.

Tradizionalmente, sono stati considerati indici di ridotta riserva ovarica, oltre l'età avanzata della paziente, un aumento delle concentrazioni plasmatiche di FSH e un ridotto numero di follicoli antrali contati tramite ecografia ("antral follicle count", AFC). L'AFC, valutata tramite ecografia permette di valutare meglio la riserva ovarica rispetto a FSH (5). Negli ultimi anni è stato però dimostrato che il miglior indice in grado di rappresentare la riserva ovarica è AMH. Infatti le sue concentrazioni sieriche sono proporzionali al numero di follicoli antrali presenti nelle ovaie, che diminuisce costantemente con il progredire dell'età. Il numero dei follicoli antrali che ogni mese entrano nella fase di crescita, dipende dalle dimensioni della riserva ovarica (5, 6). AMH è un marcatore indipendente dal complesso circuito a feedback dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi; il suo valore quindi non è influenzato dalle eventuali fluttuazioni di estrogeni e gonadotropine, al contrario di FSH. Le concentrazioni sieriche di AMH mostrano scarsa variabilità inter- e intra-ciclo mestruale, pertanto può essere misurato in qualsiasi giorno del ciclo a differenza di FSH e di AFC, risultando di più semplice utilizzo nella pratica clinica (7). Inoltre, al contrario di AFC, la concentrazione di AMH non è influenzata dalla presenza di follicoli atresici. È stato anche dimostrato che la concentrazione sierica di AMH correla positivamente con AFC misurata al terzo giorno del ciclo mestruale e negativamente con i livelli di FSH ed età della donna (8).

AMH non correla con la riserva ovarica in donne affette da sindrome dell'ovaio policistico (PCOS). All'esame istologico, le donne con PCOS mostrano un normale numero di follicoli primordiali, mentre il numero di follicoli antrali è doppio rispetto ad un ovaio non policistico, causando concentrazioni sieriche di AMH raddoppiate rispetto a quanto atteso sulla base della reale riserva ovarica (9).

Recentemente, è stato proposto di utilizzare la determinazione di AMH anche per la selezione del protocollo di stimolazione ovarica più appropriato per ogni paziente infertile che ricorre alla PMA. La dimensione della coorte dei follicoli reclutabili in seguito a stimolazione ovarica, infatti, riflette il pool di follicoli primordiali residuo. La stimolazione ovarica con induzione della crescita follicolare multipla (ICFM) è parte integrante dei programmi di PMA ed è spesso applicata in modo standardizzato indipendentemente dalle caratteristiche individuali della paziente. Il protocollo di stimolazione standard prevede la somministrazione di ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) agonista, accompagnato da una dose iniziale di gonadotropine pari a 225 UI al giorno. Le pazienti rispondono in maniera variabile alla stimolazione ovarica standard, tanto che è possibile classificarle in base alla risposta ottenuta. Si definisce normo-responsiva una paziente alla quale, in seguito a

stimolazione, possono essere prelevati un numero variabile di ovociti compreso tra 6 e 14 (10). Queste pazienti presentano buone probabilità di successo dopo procedure di PMA. Se la stimolazione porta alla raccolta di un numero di ovociti  $\leq 3$ , la paziente viene definita ipo-responsiva (11). Generalmente una risposta di questo tipo si riscontra in donne con scarsa riserva ovarica. In alcuni casi, la terapia risulta essere inefficace e il ciclo di stimolazione deve essere sospeso causando grande frustrazione nella paziente. Al contrario, pazienti con una buona riserva ovarica possono risultare iper-responsive ai protocolli di stimolazione ovarica (12). Una iper-risposta è il principale fattore di rischio della sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS), caratterizzata da una eccessiva risposta ovarica al trattamento con le gonadotropine. Tale sindrome ha uno spettro variabile di manifestazioni cliniche che va da uno stato di malessere generale, in tal caso la paziente deve essere tenuta sotto osservazione, ad una forma più severa che richiede l'ospedalizzazione e cure intensive. Da qui l'estrema importanza di predirne la comparsa per evitare danni alle pazienti e la possibile interruzione del ciclo di PMA. L'insorgenza della OHSS sembra essere associata a livelli di AMH più elevati rispetto a quelli delle pazienti normo-responsive (8). Non vi è tuttavia la possibilità di predirne con certezza l'insorgenza in quanto, nello sviluppo della sindrome, intervengono molte variabili individuali ancora poco note.

Dal momento che è presente una certa variabilità inter-individuale nella risposta alla stimolazione, sarebbe opportuno applicare un protocollo personalizzato, basato sulla corretta predizione della risposta ovarica (12). Nella pratica clinica risulta peraltro difficile stabilire quale sia il miglior protocollo terapeutico da somministrare; generalmente vengono presi in considerazione oltre a FSH, l'età della paziente e, se disponibili, i risultati di cicli di stimolazione ovarica precedenti. Tali parametri mostrano tuttavia dei limiti. Infatti, nonostante il declino della riserva ovarica con il progredire dell'età sia stato ampiamente dimostrato, esiste una grande variabilità inter-individuale: pazienti della stessa età possono avere riserva ovarica e di conseguenza risposta alla terapia molto variabili. Le modificazioni della concentrazione sierica di FSH, invece, si verificano piuttosto tardi nel processo di invecchiamento ovarico; inoltre FSH mostra fluttuazioni inter- e intra-ciclo mestruale che rendono poco accurata la sua misura al terzo giorno del ciclo mestruale. Per la predizione dell'entità della risposta ovarica è stato quindi proposto di valutare altri indici di riserva ovarica quali AFC e AMH, soprattutto per le pazienti che ricorrono ai trattamenti per fecondazione in vitro (IVF) per la prima volta (13). Numerosi studi hanno dimostrato una forte correlazione positiva tra il numero di ovociti prelevati dopo stimolazione ovarica e AMH e AFC, ma solo pochi hanno confrontato la capacità di questi due parametri nel discriminare le pazienti che potenzialmente possono presentare risposte estreme. Se confrontato con AFC, AMH potrebbe essere un marcatore più affidabile e pratico per la predizione della risposta ovarica, dal momento che la sua concentrazione

ematica non è influenzata dalla presenza dei follicoli atresici e che non soffre di variabilità inter- e intra-ciclo mestruale (6). I marcatori di riserva ovarica, in aggiunta all'anamnesi e all'età avanzata della paziente, possono essere dunque usati per predire l'eventuale scarsa risposta, da sospettarsi nel caso in cui la paziente presenti elevati livelli di FSH e bassi valori di AFC e di AMH (14).

Allo scopo di valutare il possibile utilizzo di AMH come marcatore di risposta alla stimolazione, abbiamo condotto uno studio su una popolazione di donne candidate a un primo ciclo di PMA presso il Presidio Ospedaliero Macedonio Melloni di Milano negli anni 2014, 2015, 2016. In questo lavoro abbiamo confrontato le caratteristiche diagnostiche di AMH rispetto agli indici valutati tradizionalmente per stimare la risposta alla terapia. Abbiamo inoltre valutato la sua abilità nel discriminare le pazienti ipo-responsive dalle normo-responsive.

L'individuazione del miglior trattamento di stimolazione in base alla predizione della risposta alla stimolazione è un tema che sta acquisendo sempre maggior importanza in quanto permette di massimizzare i successi, eliminare i rischi iatrogeni e minimizzare il rischio di cancellazione del ciclo. Nelle pazienti ipo-responsive, la riduzione del numero dei cicli cancellati porta ad una riduzione dei costi e probabilmente ad una diminuzione delle coppie che abbandonano i programmi di PMA a causa dello stress fisico e/o psicologico correlato al fallimento del trattamento (12). Lo scopo dell'identificazione pre-trattamento delle pazienti ipo-responsive non è però quello di escludere le pazienti con prognosi di scarsa risposta dai programmi di PMA: è stato infatti dimostrato che le ipo-responsive possono rispondere adeguatamente alle terapie se sottoposte a dosi massimali di farmaco, ed essere così in grado di portare a termine gravidanze con esito positivo (15).

## MATERIALI E METODI

### Casistica

Per il presente studio pilota abbiamo reclutato un totale di 157 donne infertili e candidate al primo ciclo di trattamento per fecondazione in vitro ed embrio transfer (FIVET) o inseminazione intra citoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) che, nel periodo compreso tra gennaio 2014 e giugno 2016, si sono recate presso il Servizio di Medicina di Laboratorio (SMEL) del Presidio Ospedaliero Macedonio Melloni, per eseguire la determinazione di AMH e FSH per la valutazione della riserva ovarica. Dallo studio sono state escluse 12 pazienti alle quali, in seguito agli accertamenti, è stata diagnosticata la sindrome dell'ovaio policistico. Nella popolazione studiata, l'infertilità era causata da problemi ormonali femminili nel 18,9% dei casi, femminili meccanici nel 17,9%, maschili nel 29,2%, da problemi di entrambi i partners nel 19,8%, mentre nel 14,2% l'infertilità era idiopatica.

Il consenso informato è stato ottenuto da tutte le pazienti incluse nel presente studio. Tutte le procedure

descritte nello studio sono state attuate in conformità alle norme etiche stabilite dalla dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996 ([http://www.wma.net/e/humanrights/policy\\_meetings.htm](http://www.wma.net/e/humanrights/policy_meetings.htm)).

### Conta dei follicoli antrali

La conta dei follicoli antrali e la normale anatomia pelvica sono state indagate tramite ecografia transvaginale tra 3' e il 5' giorno del ciclo mestruale precedente l'inizio della stimolazione ovarica controllata. Nella conta follicolare rientrano i follicoli di diametro compreso tra i 2 e i 10 mm, contati nelle due ovaie. È stato utilizzato un ecografo LOGIQ Vision della GE Healthcare.

### Determinazioni ormonali

I campioni ematici delle donne prese in considerazione in questo studio, sono stati raccolti al 3' giorno di un ciclo mestruale spontaneo, entro i tre mesi precedenti la stimolazione ovarica. Per la determinazione di FSH è stato utilizzato un test immunometrico automatizzato eseguito con metodica di ElettroChemiLuminescenza (ECLIA) su strumentazione Cobas® e601 della ditta Roche. Per la determinazione delle concentrazioni di AMH è stato utilizzato il kit ELISA Ultrasensitive Anti-Mullerian Hormone/Mullerian Inhibiting Substance (AnshLabs), su strumento automatizzato DSX® della ditta Technogenetics.

### Analisi statistica

Per effettuare le analisi statistiche dei dati è stato utilizzato il software Statistical Program for Social Sciences (SPSS) 20.0.

Le caratteristiche delle pazienti, classificate come ipo-responsive o normo-responsive, sono state comparate in funzione della risposta ovarica alla stimolazione. Per le variabili continue, espresse come media  $\pm$  deviazione standard, è stato utilizzato il test t di Student per campioni indipendenti, mentre per le variabili categoriche, espresse come valore percentuale, è stato utilizzato il test del  $\chi^2$  (Chi-quadro). I valori di AMH, FSH e AFC sono espressi come mediana; per questi parametri, che non mostrano distribuzioni gaussiane, è stato utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon per campioni indipendenti. Per valutare l'esistenza di correlazione tra i marcatori di riserva ovarica e il numero di ovociti prelevati è stata effettuata l'analisi di correlazione di Spearman. Per esaminare l'associazione tra i marcatori di riserva ovarica e la ipo-risposta sono state utilizzate la regressione logistica univariata e multivariata. Per ogni marcatore analizzato è stata testata l'abilità di discriminare le pazienti ipo-responsive e normo-responsive, calcolando l'area (AUC) sotto la curva ROC ("Receiver Operating Characteristic"). Le curve ROC sono state ottenute utilizzando il software MedCalc. I risultati ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi con un valore di  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

Nell'analisi finale sono state incluse 145 pazienti, candidate al primo ciclo di PMA. 30 pazienti, pari al 20,5% delle totali, hanno mostrato scarsa risposta alla stimolazione e sono state incluse nel gruppo delle ipo-responsive; le restanti 115 pazienti (79,5%) sono state arruolate nel gruppo delle normo-responsive, in quanto sono stati recuperati un numero di ovociti compreso tra 4 e 16. Per la definizione delle pazienti ipo-responsive è stato seguito il criterio stabilito dall'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) durante la Consensus Conference del 2011 ( $\leq 3$  ovociti prelevati dopo stimolazione) (11).

In alcuni casi, è stato necessario interrompere il ciclo di PMA: ne sono state indagate le cause considerando dapprima il numero totale della pazienti e poi i due gruppi selezionati. La percentuale di cicli di PMA interrotti è pari al 15,1% delle 145 pazienti prese in esame. Nello specifico, nel 7,6% a causa di scarsa stimolazione ovarica, in quanto non sono stati recuperati ovociti o i pochi prelevati non hanno permesso di avere embrioni; nel 2,7% per rischio di OHSS e nel 4,8% per altre cause.

Considerando i singoli gruppi, in quello delle normo-responsive, la cancellazione del ciclo si è resa necessaria in 11 pazienti, pari al 9,6% dei casi, di cui in 7 (6,1%) per motivi diversi (coliche addominali, ispessimento dell'endometrio, assenza del partner) mentre in 4 pazienti (3,5%) per rischio di sviluppo di OHSS. Nel gruppo delle ipo-responsive il ciclo è stato cancellato in 10 pazienti (33,3%) per scarsa risposta. Le pazienti i cui cicli sono stati cancellati a causa di risposta scarsa o eccessiva non sono state incluse nelle analisi statistiche relative alla gravidanza.

### Correlazione di Spearman tra ormone anti-Mülleriano (AMH) e altri marcatori di riserva ovarica

AMH correla positivamente con AFC (Spearman

$R=0,572$ ,  $p < 0,0001$ ) e negativamente con FSH (Spearman  $R=-0,410$ ,  $p < 0,0001$ ) e l'età (Spearman  $R=-0,319$ ,  $p < 0,0001$ ) in modo statisticamente significativo. Anche AFC correla negativamente con FSH (Spearman  $R=-0,276$ ,  $p < 0,001$ ) e l'età (Spearman  $R=-0,283$ ,  $p < 0,001$ ). FSH correla dunque negativamente con AFC e AMH, ma non mostra correlazione con l'età.

### Correlazione di Spearman tra numero di ovociti prelevati e i marcatori di riserva ovarica

Il numero di ovociti prelevati dopo stimolazione ovarica correla negativamente e in maniera statisticamente significativa con l'età (Spearman  $R=-0,325$ ,  $p < 0,0001$ ), con FSH (Spearman  $R=-0,241$ ,  $p < 0,004$ ) mentre correla positivamente con AMH (Spearman  $R=0,504$ ,  $p < 0,0001$ ) e AFC (Spearman  $R=0,365$ ,  $p < 0,0001$ ). Il numero di ovociti prelevati ha mostrato una correlazione più forte con AMH, rispetto ad AFC, età, FSH.

### Comparazione delle caratteristiche demografiche e cliniche nei due gruppi (ipo e normo-responsive)

Le 30 pazienti ipo-responsive avevano un'età media significativamente ( $p < 0,01$ ) più elevata delle normo-responsive. Le mediane relative alla concentrazione ematica di AMH e ad AFC sono risultate significativamente più basse nel gruppo delle ipo-responsive (rispettivamente  $p=0,012$  e  $p=0,005$ ), mentre FSH non ha mostrato differenze significative nei due gruppi. Nel gruppo delle normo-responsive si è registrata una percentuale più elevata di gravidanze (39,1%) rispetto al gruppo delle ipo-responsive (16,6%), e questa differenza è statisticamente significativa ( $p=0,035$ ). I dati sono riassunti in Tabella 1.

Il protocollo di trattamento più utilizzato è stato quello degli antagonisti del GnRH in entrambi i gruppi e le

**Tabella 1**

Confronto delle caratteristiche demografiche e cliniche dei due gruppi di pazienti, ipo-responsive e normo-responsive, effettuato con test t di Student per variabili continue e  $\chi^2$  per le categoriche. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. AMH, AFC e FSH, che non mostrano distribuzioni gaussiane, sono state comparate utilizzando il test non parametrico di Wilcoxon per campioni indipendenti, e i loro valori sono espressi come mediana e (valore minimo-valore massimo)

Generali	Ipo-responsive (n = 30)	Normo-responsive (n = 115)	p
Età (anni)	38 $\pm$ 2,9	36,65 $\pm$ 3,86	<0,01
AMH (ng/mL)	0,9 (0,1-4,1)	2,3 (0,1-7)	<0,012
FSH (mUI/mL)	7,65 (1,8-21,9)	7 (2,7-15,2)	NS
AFC	6 (1-12)	10 (2-23)	<0,005
Ovociti prelevati (N)	2,0 $\pm$ 1,0	8,68 $\pm$ 3,5	NA
Fumatrici N (%)	3 (11,1)	25 (21,9)	NS
Gravidanze N (%)	5 (16,6)	45 (39,1)	0,035
Protocollo antagonista N (%)	23 (77,3)	92 (80)	NS
Protocollo agonista N (%)	7 (22,7)	23 (20)	

AMH, ormone anti-Mülleriano; FSH, ormone follicolo-stimolante; NS, statisticamente non significativo; AFC, "antral follicle count"; NA, non applicabile.

percentuali relative al loro utilizzo non hanno mostrato differenze statisticamente significative, infatti il valore di  $p$  ottenuto con il test del  $\chi^2$  è risultato pari a 0,69.

### Analisi delle curve ROC

L'analisi è stata seguita da comparazione a coppie delle  $ROC_{AUC}$  studiate. Le  $ROC_{AUC}$  possono avere valori compresi tra 0,5 (nessun potere discriminante) e 1,0 (discriminazione perfetta). L'analisi mostra che AMH presenta la più elevata  $ROC_{AUC}$ , pari a 0,789 (95% IC: 0,713–0,852), indicando che questo marcatore possiede un buon potere discriminante fra i gruppi in esame. La  $ROC_{AUC}$  di AMH è significativamente più elevata della  $ROC_{AUC}$  di FSH che è pari a 0,626 (95% IC: 0,542–0,704), ( $p=0,004$ ) e dell'età pari a 0,634 (95% IC: 0,550–0,712), ( $p=0,013$ ) (Figura 1) indicando la superiore capacità di questo marcatore nella discriminazione delle pazienti ipo-responsive. La  $ROC_{AUC}$  di AFC mostra che questo parametro ha potere discriminante simile a quello di AMH, avendo una  $ROC_{AUC}$  pari a 0,767 (95% IC: 0,690–0,833). La differenza tra le due  $ROC_{AUC}$  non è statisticamente significativa ( $p=0,63$ ) (Figura 2). La  $ROC_{AUC}$  di AFC è significativamente più elevata della  $ROC_{AUC}$  di FSH e dell'età ( $p=0,02$  in entrambi i casi).

### Analisi della regressione logistica univariata e multivariata

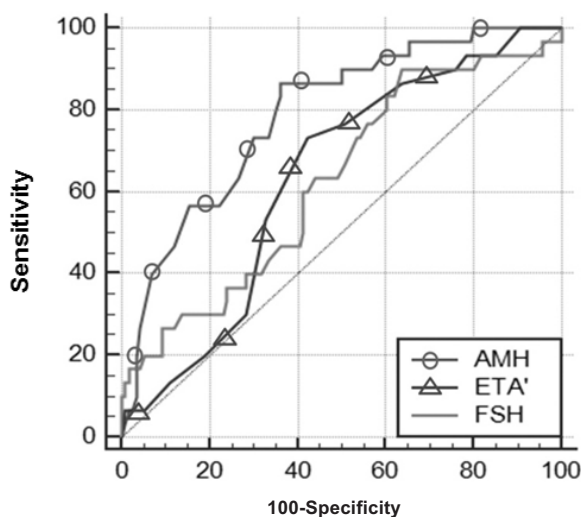
L'analisi della regressione logistica univariata (Tabella 2) delle variabili prese in considerazione mostra che tutti i parametri sono significativamente correlati al numero di ovociti prelevati. L'analisi della regressione logistica multivariata è stata eseguita prima prendendo in considerazione solo i marcatori tradizionali di risposta

ovarica, FSH ed età (Tabella 2, modello 1), poi includendo nell'analisi AMH (Tabella 2, modello 2). Mentre età e FSH non risultano correlati alla risposta ovarica, AMH risulta essere significativamente associato alla risposta ovarica ( $p=0,0017$ ) (Tabella 2, modello 2), così come AFC (Tabella 2, modello 3). Quando nell'analisi vengono presi in esame i quattro marcatori solo AMH e AFC mantengono la significatività ( $p=0,02$  e  $p=0,03$ ) e si nota un aumento dell'area sotto la curva, pari a 0,816 (Tabella 2, modello 4). AMH e AFC correlano con la risposta ovarica e aumentano il potere predittivo del test quando combinati assieme.

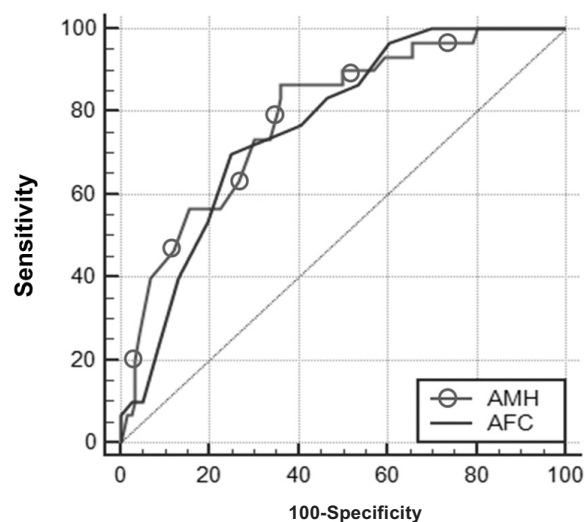
### Indici di riserva ovarica e gravidanza dopo fecondazione *in vitro* (IVF)

Per valutare le associazioni tra i marcatori di riserva ovarica e l'ottenimento di gravidanza dopo IVF, abbiamo preso in analisi 124 pazienti, dopo esclusione delle 21 pazienti a cui era stato sospeso il ciclo di stimolazione. Applicando l'analisi di correlazione di Spearman è risultato che le gravidanze ottenute in seguito al ciclo di IVF correlano negativamente in maniera statisticamente significativa solamente con l'età (Spearman  $R=-0,179$ ,  $p=0,048$ ) e AMH (Spearman  $R=-0,041$ ,  $p=0,65$ ), FSH (Spearman  $R=-0,069$ ,  $p=0,44$ ), e positivamente con AFC (Spearman  $R=0,049$ ,  $p=0,58$ ) e il numero di ovociti prelevati (Spearman  $R=0,137$ ,  $p=0,13$ ).

L'analisi della regressione logistica univariata dei parametri clinici, ormonali ed ecografici dimostra che solo l'età è correlata alla gravidanza ( $p=0,05$ ) anche se l'abilità discriminante dell'età nella predizione di gravidanza è bassa, con una  $ROC_{AUC}$  pari a 0,606. AFC e AMH, non sono predittivi per gravidanza al pari del numero di ovociti prelevati.



**Figura 1**  
Analisi della curva ROC per valutare il potere discriminante di ormone anti-mülleriano (AMH), ormone follicolo-stimolante (FSH) ed età nelle pazienti ipo- e normo-responsive in seguito a stimolazione ovarica controllata durante le procedure di procreazione medicalmente assistita. La curva di AMH è significativamente più elevata.



**Figura 2**  
Analisi delle curve ROC per misurare il potere discriminante di ormone anti-mülleriano (AMH) e numero dei follicoli antrali (AFC) tra le pazienti normo- e ipo-responsive. Le due aree non mostrano differenze statisticamente significative.

**Tabella 2**

Analisi della regressione logistica univariata e multivariata per la valutazione della relazione tra la scarsa risposta e l'età, ormone follicolo-stimolante (FSH), ormone anti-Mülleriano (AMH), conta dei follicoli antrali (AFC)

		p	Odds ratio	95% CI	ROC(AUC)
<i>Univariata</i>					
	Età	0,02	1,13	1,00-1,27	0,634
	AMH	<0,0001	0,37	0,22-0,61	0,789
	FSH	<0,006	1,2	1,05-1,36	0,626
	AFC	<0,0001	0,76	0,67-0,87	0,767
<i>Multivariata</i>					
Modello 1	Età	0,03	1,14	1,01-1,3	0,676
	FSH	0,007	1,19	1,04-1,36	
Modello 2	Età	0,35	1,06	0,92-1,23	0,788
	FSH	0,19	1,07	0,93-1,23	
	AMH	0,0017	0,43	0,25-0,72	
Modello 3	Età	0,19	1,09	0,95-1,25	0,781
	FSH	0,14	1,11	0,96-1,2	
	AFC	0,001	0,79	0,69-0,9	
Modello 4	Età	0,5	1,05	0,9-1,22	0,816
	AMH	0,02	0,56	0,32-0,96	
	FSH	0,35	1,04	0,9-1,21	
	AFC	0,03	0,84	0,72-0,98	

## DISCUSSIONE

Dal momento che, in seguito a induzione dell'ovulazione e della crescita follicolare multipla per procedure di PMA, si possono verificare inaspettatamente risposte scarse o eccessive, la dose di gonadotropine e il tipo di protocollo dovrebbero essere personalizzati per ogni paziente. La scelta di un protocollo di stimolazione ormonale, basato sulla stima accurata della riserva ovarica, permette di ottenere una risposta ottimale e di aumentare le possibilità di gravidanza (17). Tradizionalmente, il parametro considerato al momento dell'assegnazione della terapia è sempre stato l'età della paziente, nonostante si sia osservato che pazienti coetanee possano avere riserva ovarica diversa e di conseguenza una risposta alla terapia molto variabile. Altri biomarcatori, normalmente utilizzati per la valutazione della riserva ovarica, possono essere usati per predire la risposta alla stimolazione (18), tra questi ha suscitato grande interesse AMH. Recentemente questo ormone è stato infatti proposto come predittore di scarsa o eccessiva risposta alla stimolazione. Nel presente studio è stata indagata la correlazione tra le concentrazioni plasmatiche di AMH e la scarsa risposta ovarica, in modo da valutarne il possibile utilizzo in previsione di un protocollo terapeutico personalizzato. AMH, AFC e FSH sono stati correlati al numero di ovociti prelevati ed è stata dimostrata una robusta correlazione tra AMH e la

risposta ovarica alla stimolazione. In particolare, il numero di ovociti prelevati mostra correlazione più forte con AMH rispetto a FSH, età delle pazienti e AFC. Questi dati confermano i risultati ottenuti in altri studi (16). Al contrario, nello studio di Tsakos E et al. (14), AFC mostrava correlazione con il numero di ovociti prelevati dopo stimolazione ovarica più forte rispetto ad AMH. Discrepanze tra i risultati di studi diversi possono essere spiegate dalle differenze nelle dimensioni e caratteristiche delle popolazioni studiate, differenti metodiche utilizzate per misurare AMH, variabilità nella stima di AFC che è operatore dipendente e può variare in base al giorno del ciclo mestruale in cui è stata effettuata l'ecografia.

Nel nostro studio la  $ROC_{AUC}$  di AMH è risultata essere più ampia della  $ROC_{AUC}$  di FSH e dell'età, indicando la maggiore predittività di questo marcatore nella discriminazione delle pazienti ipo-responsive, come è evidente dalla Figura 1. Questo risultato conferma quanto affermato nello studio di Hamdine O et al. (19), in cui AMH ha mostrato una  $ROC_{AUC}$  più elevata di quella dell'età nella predizione della scarsa risposta alla stimolazione.

Dal momento che AMH è un marcatore più accurato nella stima della risposta ovarica rispetto ai parametri valutati tradizionalmente quali età e FSH, esso dovrebbe essere sempre preso in considerazione per la scelta del trattamento di stimolazione più appropriato. Nella nostra analisi la  $ROC_{AUC}$  di AFC mostra che questo

parametro ha un potere discriminante simile a AMH nell'identificazione delle pazienti ipo-responsive (Figura 2). Risultati simili sono stati ottenuti nello studio di Nardo LG et al. (20), in cui AMH ha mostrato una predittività migliore di FSH in modo statisticamente significativo, ma non di AFC.

Inoltre, l'analisi della regressione logistica multivariata permette di evidenziare che AMH e AFC sono gli unici parametri correlati in modo statisticamente significativo alla scarsa risposta (Tabella 2, modello 4). I nostri risultati sono in linea con quanto segnalato da numerosi altri studi in cui è evidente che AMH e AFC hanno lo stesso livello di accuratezza e valore clinico nella predizione della scarsa risposta ovarica delle donne sottoposte a trattamenti per IVF (20, 21).

Visto che l'utilizzo di protocolli diversi e dosi iniziali di FSH diverse possono influenzare il numero di ovociti prelevati, ci siamo chiesti se, nella nostra casistica, il numero di ovociti raccolti in seguito alla stimolazione ovarica potesse essere stato influenzato dal tipo di protocollo, GnRH agonisti o antagonisti, o dalla differente dose iniziale di gonadotropine. In realtà, i due protocolli di trattamento sono stati utilizzati in una percentuale simile nelle due popolazioni messe a confronto e la maggior parte delle pazienti che si sono rivelate essere ipo-responsive, erano state trattate con 225 o 300 UI al giorno di gonadotropine, così come gran parte delle pazienti normo-responsive. Quindi i risultati da noi ottenuti non dovrebbero essere stati influenzati da queste variabili.

Nel nostro studio l'ottenimento della gravidanza correlava solo con l'età e non con FSH, AMH e AFC, anche se l'età ha mostrato un basso potere discriminante, confermando che la gravidanza è una condizione che dipende da numerosi altri fattori tra cui ad esempio difetti uterini o tubarici e l'infertilità maschile. Questi risultati sono in accordo con una revisione sistematica la cui conclusione è stata che AMH non è predittivo dell'instaurarsi di gravidanza dopo IVF (12). In un altro lavoro, al contrario, la concentrazione di AMH risulta essere associata alla percentuale di nati vivi dopo IVF (22). AMH, quindi, non può essere utilizzato come parametro di fertilità.

Riassumendo, AMH e AFC sembrano essere marcatori utili per valutare la riserva e la risposta ovarica nei trattamenti di PMA ed è consigliabile considerare i loro valori per decidere il protocollo terapeutico a cui sottoporre la paziente. AFC è un esame facile da eseguire e il numero dei follicoli può essere stimato durante l'ecografia transvaginale nei primi giorni del ciclo mestruale; è un test diagnostico richiesto ed eseguito routinariamente. D'altro canto, AFC mostra un'elevata variabilità inter-operatore, ed è influenzata dalle caratteristiche tecniche dell'ecografo. È un'analisi relativamente costosa in quanto richiede la disponibilità di apparecchiatura e di personale specializzato. Inoltre questo parametro soffre di variabilità intra-ciclo e non permette la distinzione dei follicoli atresici. Nel presente studio, l'ecografia per stimare il numero dei follicoli antrali e le procedure di recupero degli ovociti sono state

eseguite esclusivamente da due ginecologi, riducendo quindi la variabilità inter-operatore rispetto ad altri studi. Dal momento che la misura di AFC non è standardizzata, non è possibile utilizzare un valore soglia ricavato dalla letteratura, per predire la risposta ovarica. Questo infatti dovrebbe essere calcolato all'interno del centro di PMA per singolo operatore, cosa difficilmente attuabile nella pratica clinica. Analogamente, non è al momento ancora possibile stabilire un valore soglia universale di AMH per la predizione della scarsa risposta. Infatti, data la struttura molecolare di AMH, la sua concentrazione viene misurata con metodi immunometrici che usano differenti sistemi di rilevazione del segnale analitico. Attualmente sono disponibili in commercio nuovi saggi totalmente automatizzati, che presentano buone caratteristiche tecniche, sono più riproducibili e permettono di ridurre i costi e i tempi di esecuzione (23). La varietà di metodiche, la disponibilità di diversi anticorpi impiegati, i diversi calibratori utilizzati, sono i motivi per cui i vari saggi immunometrici in commercio posseggono sensibilità, specificità, linearità, intervallo di normalità, precisione e accuratezza diverse tra di loro. La mancanza di uno standard internazionale, rende inoltre impossibile la standardizzazione delle misure e quindi anche la comparazione tra risultati ottenuti con metodi diversi. A questo proposito, un aspetto importante da discutere riguarda la proposta di un valore soglia di AFC e AMH universali, da utilizzare per la classificazione delle pazienti ipo-responsive. In occasione della già citata Consensus Conference dell'ESHRE (11), è stato stabilito che si debba considerare ipo-responsiva una paziente che presenti almeno due dei seguenti fattori: età materna avanzata (>40 anni) o altri fattori di rischio anamnestici; una precedente risposta ovarica ridotta dopo stimolazione ovarica a dosi standard; AMH minore di 0,5-1,1 ng/mL e AFC inferiore a 5-7 (11). Nel nostro studio, il valore di AMH corrispondente a miglior sensibilità e specificità per la discriminazione delle pazienti ipo-responsive era inferiore a 1,6 ng/mL e quello di AFC era inferiore a 7. Risulta quindi evidente che l'adozione di valori soglia universali di AMH per la discriminazione delle pazienti ipo-responsive non è attualmente possibile.

La standardizzazione internazionale e l'utilizzo di una robusta metodica automatizzata renderebbero AMH il biomarcatore di risposta ovarica di prima scelta, permettendo la definizione di valori soglia universali sulla base dei quali scegliere il miglior protocollo terapeutico. AFC continuerà comunque ad avere un ruolo importante nella pratica clinica dal momento che questo parametro permette di visualizzare le dimensioni dei follicoli crescenti, informazione cruciale nell'analisi dell'andamento della stimolazione.

Recentemente, è stato proposto l'utilizzo di un algoritmo basato sulle concentrazioni di AMH, capace di indicare la dose più appropriata di gonadotropine da somministrare durante la stimolazione ovarica. Questa strategia di trattamento ha permesso di ottenere una riduzione sia delle risposte estreme che dei cicli cancellati, un aumento delle probabilità di gravidanza e

una riduzione dei costi diretti e indiretti (21). La scelta della terapia di stimolazione ovarica personalizzata sulla base dei valori di AMH porta ad un miglioramento degli esiti della IVF, della sicurezza e della soddisfazione della paziente nonché a una diminuzione dei costi (24).

Nel 2017 è stato pubblicato un trial clinico che compara l'efficienza della selezione della dose iniziale di FSH in base a un nomogramma basato su più biomarcatori (età, FSH, AMH) contro la strategia basata sull'età (25). Nello studio, viene misurata la porzione di donne con una risposta ottimale (8-14 ovociti prelevati) nei due gruppi. La risposta ottimale è stata osservata nel 63% delle pazienti nelle quali la dose di farmaco è stata decisa sulla base del nomogramma, mentre nel gruppo di controllo la risposta ottimale è stata osservata nel 42% delle pazienti. Non sono state trovate differenze significative nella percentuale di gravidanze. Lo studio mostra che la dose iniziale di gonadotropine selezionata in base alla riserva ovarica è associata a un aumento della percentuale di pazienti che rispondono bene alla stimolazione (25) senza peraltro che questo incida sul numero di gravidanze.

In conclusione, la valutazione della riserva ovarica è utile per l'identificazione delle pazienti a rischio di bassa risposta ovarica alla stimolazione. Nel nostro studio, AMH è risultato in grado di discriminare con maggior efficienza le pazienti a rischio di scarsa risposta rispetto ai marcatori tradizionali, quali età e FSH. Sulla base di questa evidenza, è possibile raccomandare l'inclusione di AMH nei protocolli decisionali della terapia di stimolazione ovarica personalizzata, al fine di ridurre il rischio di cancellazione del ciclo. Un approccio di questo tipo porterebbe alle pazienti, e più in generale alla coppia, beneficio sia fisico che psicologico. Inoltre permetterebbe di ridurre i costi associati a un trattamento non efficace. Sia AMH che AFC si sono mostrati in grado di discriminare le pazienti a rischio di scarsa risposta da quelle normo-responsive. L'oggettività, la bassa variabilità intra- e inter-ciclo mestruale, e la probabile futura standardizzazione della misura, rendono AMH il marcatore di elezione per la valutazione della riserva ovarica. Per quanto riguarda la percentuale di gravidanze, AMH non ha evidenziato alcuna correlazione, probabilmente a causa dei numerosi fattori che intervengono nell'instaurarsi di una gravidanza.

### CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

1. di Clemente N, Jamin S, Lugovskoy A, et al. Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. *Mol Endocrinol* 2010;11:2193-206.
2. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77-83.
3. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;142:4891-9.
4. Sacchi S, D'Ippolito G, Sena P, et al. The anti-Müllerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to both FSH and LH. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:95-100.
5. Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, et al. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril* 2010;94:1044-51.
6. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014;20:370-85.
7. La Marca A, Malmusi S, Giulini S, et al. Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod* 2004;19:2738-41.
8. Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, et al. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003;18:323-7.
9. Pigny P, Jonard S, Robert Y, et al. Serum anti-Mullerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:941-5.
10. Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, et al. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reprod Biomed Online* 2015;31:486-96.
11. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, et al. ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;26:1616-24.
12. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014;20:124-40.
13. Hamdine O, Eijkemans MJ, Lentjes EW, et al. Ovarian response prediction in GnRH antagonist treatment for IVF using anti-Müllerian hormone. *Hum Reprod* 2015;30:170-8.
14. Tsakos E, Tolikas A, Daniilidis A, et al. Predictive value of anti-müllerian hormone, follicle-stimulating hormone and antral follicle count on the outcome of ovarian stimulation in women following GnRH-antagonist protocol for IVF/ET. *Arch Gynecol Obstet* 2014;290:1249-53.
15. Broer SL, Mol BW, Hendriks D, et al. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril* 2009;91:705-14.
16. Nelson SM, Klein BM, Arce JC. Comparison of antimüllerian hormone levels and antral follicle count as predictor of ovarian response to controlled ovarian stimulation in good-prognosis patients at individual fertility clinics in two multicenter trials. *Fertil Steril* 2015;103:923-30.
17. Nardo LG, Fleming R, Howles CM, et al. Conventional ovarian stimulation no longer exists: welcome to the age of individualized ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 2011;23:141-8.
18. Conforti A, Cariati F, Vallone R, et al. Individualization of treatment in controlled ovarian stimulation: myth or reality? *Biochim Clin* 2017;41:294-305.
19. Hamdine O, Eijkemans MJ, Lentjes EW, et al. Ovarian

- response prediction in GnRH antagonist treatment for IVF using anti-Müllerian hormone. *Hum Reprod* 2015;30:170-8.
20. Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H, et al. Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009;92:1586-93.
  21. La Marca A, Papaleo E, Grisendi V, et al. Development of a nomogram based on markers of ovarian reserve for the individualisation of the follicle-stimulating hormone starting dose in in vitro fertilisation cycles. *BJOG* 2012;119:1171-9.
  22. Brodin T, Hadziosmanovic N, Berglund L, et al. Antimüllerian hormone levels are strongly associated with live-birth rates after assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:1107-14.
  23. Welsh P, Smith K, Nelson SM. A single-centre evaluation of two new anti-Mullerian hormone assays and comparison with the current clinical standard assay. *Hum Reprod* 2014;29:1035-41.
  24. Yates AP, Rustamov O, Nardo LG, et al. Anti-Mullerian hormone-tailored stimulation protocols improve outcomes whilst reducing adverse effects and costs of IVF. *Hum Reprod* 2011;26:2353-62.
  25. Allegra A, Marino A, La Marca A, et al. A randomized controlled trial investigating the use of a predictive nomogram for the selection of the FSH starting dose in IVF/ICSI cycles. *Reprod Biomed Online* 2017;S1472-6483:30040-8.

## Glycated albumin is correlated to insulin resistance and $\beta$ -cell secretory function in subjects at risk of developing diabetes

Chiara Bellia<sup>1</sup>, Martina Zaninotto<sup>3</sup>, Chiara Cosma<sup>3</sup>, Luisa Agnello<sup>1</sup>, Bruna Lo Sasso<sup>1</sup>, Patrizia Altavilla<sup>2</sup>, Giulia Bivona<sup>1</sup>, Giuseppe Pizzolanti<sup>2</sup>, Sergio Bernardini<sup>4</sup>, Mario Plebani<sup>3\*</sup>, Marcello Ciaccio<sup>1, 2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biopathology and Medical Biotechnologies, Section of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Medicine, University of Palermo

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, University Hospital, Palermo

<sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, University Hospital, Padua

<sup>4</sup>Department of Experimental Medicine and Surgery, Division of Clinical Biochemistry, University of Rome Tor Vergata, Rome

\*Mario Plebani and Marcello Ciaccio are both considered last Authors

### ABSTRACT

Insulin resistance and  $\beta$ -cell secretory function represent two main issues in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus (T2DM). Conflicting results have been obtained about the association between glycated albumin (GA) and body mass index (BMI), insulin resistance and  $\beta$ -cell function in diabetic patients. Actually, the relationship (if any) between GA and the markers of glucose homeostasis and insulin resistance in subjects at risk of developing diabetes, has not been completely elucidated yet. Two hundred and one patients undergoing to oral glucose tolerance test (OGTT) were enrolled in the study. Routine laboratory tests, including fasting insulin, were performed at enrollment. GA was measured on plasma-EDTA by quantILab<sup>®</sup> Glycated Albumin (Instrumentation Laboratory, A Werfen Company) on ILab Taurus analyzer. According to the plasma glucose concentration measured after 2 hours of glucose intake (2h-PG), 13 subjects (6.4%) were classified as impaired glucose tolerance (IGT). GA weakly correlated with fasting plasma glucose (FPG) ( $r=0.21$ ;  $P=0.002$ ), with HbA1c ( $r=0.16$ ;  $P=0.024$ ) but not with 2h-PG ( $P=0.7$ ). GA, but not HbA1c, was negatively correlated to H0meostasis Model Assessment for  $\beta$  cell fuction (HOMA- $\beta$ ) ( $r^2=0.23$ ;  $P<0.001$ ), to HOMA for insulin resistance (HOMA-IR) ( $r^2=0.15$ ;  $P<0.0001$ ) and to BMI ( $r^2=0.05$ ;  $P=0.001$ ). In a stepwise multivariate regression analysis including HbA1c, HOMA- $\beta$ , plasma albumin, BMI, eGFR, age, FPG, and HOMA-IR as predictors of GA, only HbA1c ( $\beta$ -coefficient: 0.04;  $P=0.038$ ) and HOMA- $\beta$  ( $\beta$ -coefficient: -0.01;  $P<0.0001$ ) were able to predict GA levels ( $r^2=0.26$ ;  $P<0.001$  for the model). Our results demonstrated that GA was associated to HOMA- $\beta$  and, to a lesser extent, to HOMA-IR and BMI. The increase of GA values can be explained by the reduction of  $\beta$ -cell secretory function in subjects with no significant increase of FPG and 2h-PG.

### INTRODUCTION

Insulin resistance and  $\beta$ -cell secretory function represent two main issues in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus (T2DM) (1). In the natural history of the disease, postprandial hyperglycemia is the first abnormality that arises from the increased endogenous production of glucose, impaired post-prandial glucose control and reduced peripheral glucose uptake by skeletal muscle cells. All these can be considered features of peripheral insulin resistance and are accompanied by progressive hyperinsulinemia (2). Gradually,  $\beta$ -cells became incapable of secreting adequate amount of insulin to overcome the metabolic

dysfunction. In clinical practice, the evaluation of  $\beta$ -cells secretory function and insulin resistance are not feasible, so several indexes have been proposed, including the H0meostasis Model Assessment (HOMA) based on fasting glucose and insulin (3). Several biomarkers have been evaluated in relation to the onset of diabetes and its related micro- and cardiovascular complications (4-6), although it is clear that the main issue in the reduction of diabetes incidence, its metabolic features and the cardiovascular outcomes is the control of the main risk factors (7-10).

Glycated albumin (GA) has been proposed as a short-term marker of glucose homeostasis. Glycation of plasmatic proteins is a non-enzymatic process and can

Correspondence to: Marcello Ciaccio, Via del Vespro 129, 90127 Palermo. Tel. 09123865701, Fax 0916553275, E-mail: marcello.ciaccio@unipa.it

Ricevuto: 01.03.2018

Revisionato: 20.04.2018

Accettato: 24.04.2018

Pubblicato on-line: 25.05.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.034

occur at different rates based on the substrate. It has been demonstrated that albumin is glycosylated in the bloodstream at a higher rate than other plasmatic proteins, including hemoglobin (11). The GA distribution has been described in both healthy subjects and diabetics, showing a significant increase in the latter (12, 13), supporting thus the GA determination in the management of diabetes. Several clinical studies demonstrated that GA decreased faster than HbA1c when the hypoglycemic therapy was initiated in patients with diabetes (14). Moreover, GA has been evaluated for the screening of diabetes in the general population and in subjects at risk, showing high diagnostic accuracy in diabetes diagnosis (15-17).

Some authors demonstrated that a negative correlation exists between GA and body mass index (BMI) in T2DM patients (18), but this finding was not replicated in patients with acute-onset type 1 diabetes (19) suggesting that this association is influenced by the different role of  $\beta$ -cell function in the pathogenesis of the different types of diabetes. Actually, it is not clear the relationship (if any) existing between GA, the other markers of glucose homeostasis and insulin resistance in subjects at risk of developing diabetes.

The aim of this observational study is to evaluate the relationship between GA, fasting plasma glucose (FPG), plasma glucose concentration measured after 2 hours from glucose intake (2h-PG), HbA1c and insulin resistance in a group of subjects at risk of diabetes who underwent to an oral glucose tolerance test (OGTT).

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

Recruitment was conducted at two major referral centers in Italy (University Hospital in Palermo; University Hospital in Padua) from September 2016 to July 2017. All patients presenting with one or more of the following risk factors for diabetes (20) were enrolled: overweight (BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> and  $< 29.9$  kg/m<sup>2</sup>) or obesity (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>); previous HbA1c from 39 to 47 mmol/mol or impaired fasting glucose (IFG) (FPG  $\geq 5.6$  mmol/L and  $< 7.0$  mmol/L) or impaired glucose tolerance (IGT) (2h-PG  $\geq 7.8$  mmol/L and  $< 11$  mmol/L); family history of diabetes; women with previous gestational diabetes; history of cardiovascular disease; hypertension ( $\geq 140/90$  mmHg or on therapy for hypertension); HDL-cholesterol  $< 0.9$  mmol/L or triglycerides  $> 6.46$  mmol/L; women with polycystic ovary syndrome; physical inactivity. Exclusion criteria were: anemia, hemoglobinopathies, recent transfusions, pregnancy, major surgery in the last six months, hypo- or hyperthyroidism, chronic liver disease, malignant diseases, any acute critical condition. Baseline demographic, biochemical and clinical characteristics of the participants undergoing to OGTT are shown in Table 1.

Blood samples, complete medical history and written informed consent were collected at enrollment. The study protocol was approved by the local Ethics Committees in

accordance with the Declaration of Helsinki, and all study participants gave informed consent.

### Laboratory analysis

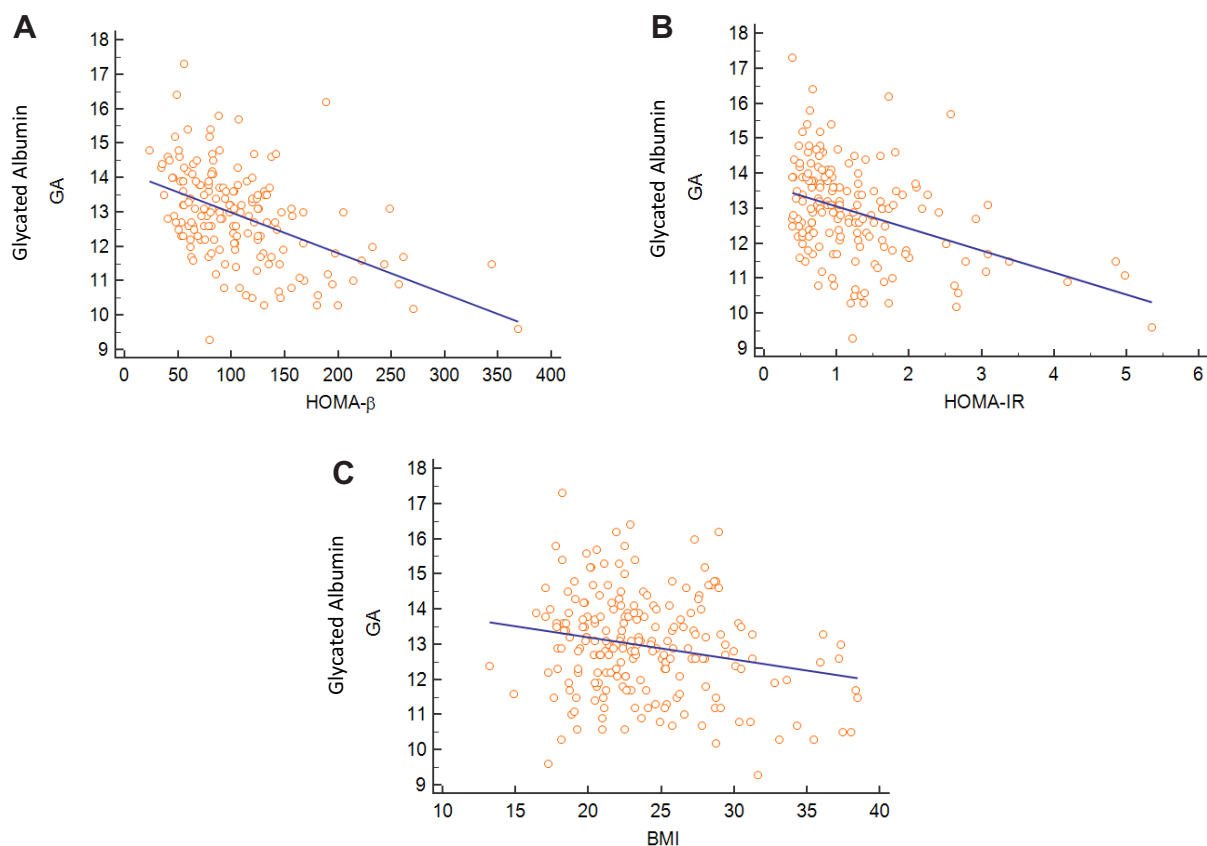
HbA1c was measured by the D100 instrument and reagents (BioRad) at the University Hospital of Palermo and by the HA8180V instrument and reagents (Menarini Diagnostics) at the other site. Both assays are based on an ion exchange high performance liquid chromatography (HPLC) method. It has been demonstrated that the two assays are highly correlated (21). Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated by the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation (22). GA was measured on plasma-EDTA by quantiLab® Glycosylated Albumin (Instrumentation Laboratory, A Werfen Company) on ILab Taurus analyzer. This enzymatic colorimetric method includes the measurement of GA and albumin. GA concentration is reported as percentage of total albumin, and corrected with the inter-method arithmetic expression designed to adhere to the

**Table 1**  
Baseline demographic, biochemical and clinical characteristics of the participants

N	201
Age, years	36 (25-54)
Males, n (%)	48 (23.9)
Caucasians, n (%)	187 (93.0)
Family history of diabetes, n (%)	74 (37.8)
BMI, kg/m <sup>2</sup>	23 (21-26)
Obesity, n (%)	20 (10)
Waist circumference, cm	85.5 $\pm$ 17.5
Albumin, g/L	42.2 $\pm$ 3.6
Total Cholesterol, mmol/L	4.7 $\pm$ 0.9
HDL Cholesterol, mmol/L	1.5 $\pm$ 0.5
Triglycerides, mmol/L	0.8 (0.6-1.2)
Insulin, $\mu$ U/mL	7 (4.5-11)
HOMA- $\beta$	93 (65-130)
HOMA-IR	0.9 (0.7-1.5)
Glycated Albumin, %	13 $\pm$ 1.4
FPG, mmol/L	4.9 (4.6-5.5)
HbA1c, mmol/mol	36 (33-38)

Data are mean $\pm$ SD or median (interquartile range).

BMI, body mass index; HOMA- $\beta$ , Homeostasis Model Assessment for  $\beta$  cell function; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment for insulin resistance; FPG, fasting plasma glucose, HbA1c, glycosylated hemoglobin; 2h-PG, plasma glucose after two hours from glucose intake.



**Figure 1**

Univariate regression analysis between glycated albumin and HOMA- $\beta$  ( $r^2=0.23$ ; intercept=14.1 [95%CI: 13.8-14.5]; slope=-0.011 [95%CI: 0.015-0.008]);  $P < 0.001$ ) (panel A).

HOMA-IR ( $r^2=0.15$ ; intercept=13.7 [95%CI: 13.3-14]; slope=-0.62 [95%CI: 0.85-0.40];  $P=0.0009$ ) (panel B).

Body Mass Index (BMI) ( $r^2=0.05$ ; intercept=14.5 [95%CI: 13.5-15.4]; slope=-0.063 [95%CI: 0.10-0.024];  $P=0.001$ ) (panel C).

HPLC method (23). Imprecision of the assay was evaluated analyzing two control samples provided by the manufacturer. At low concentration (GA 15.2%), between-run and within-run CV were 3.1% and 1.3%, respectively. At high concentration (32.1%), between-run and within-run CV were 2.5% and 0.9%, respectively. HOMA of insulin resistance (HOMA-IR) and HOMA of  $\beta$ -cell function (HOMA- $\beta$ ) indexes was calculated by the HOMA2 Calculator v2.2.3 (©Diabetes Trials Unit, University of Oxford).

### Statistical analysis

Variables were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) for continuous variables, as medians with interquartile ranges (IQR) for not-normally distributed continuous variables, and as a percentage for the categorical variables.

The correlation between values was assessed with Spearman's (Pearson) test and expressed as  $r$ .

To analyze the effect of explanatory variables on GA, univariate regression analysis was performed and results expressed as  $r^2$ . GA was considered as the dependent variable. In stepwise multivariate regression

analysis GA was the dependent variable, and HbA1c, HOMA- $\beta$ , albumin, BMI, eGFR, age, FPG, HOMA-IR were considered as explanatory variables. The statistical significance of  $P < 0.05$  was accepted for all the tests. Statistical analysis was performed using MedCalc software Version 17.9.2.

### RESULTS

The study included 201 subjects with a median age of 36 years (IQR: 25-54), 23.9% were males. According to 2h-PG, 13 subjects (6.4%) were classified as IGT. GA correlated with FPG ( $r=0.21$ ;  $P=0.002$ ), with HbA1c ( $r=0.16$ ;  $P=0.024$ ) but not with 2h-PG ( $P=0.7$ ). The GA% in the whole group was  $13 \pm 1.4$ .

According to linear regression analysis, GA was negatively correlated to HOMA- $\beta$  ( $r^2=0.23$ ;  $P < 0.001$ ; Figure 1A) and to HOMA-IR ( $r^2=0.15$ ;  $P < 0.0001$ ; Figure 1B). Interestingly, these correlations were not detected for HbA1c. GA was negatively correlated to BMI ( $r^2=0.05$ ;  $P=0.001$ ; Figure 1C) while plasma albumin was not.

Finally, in a stepwise multivariate regression analysis including HbA1c, HOMA- $\beta$ , albumin, BMI, eGFR, age,

FPG, and HOMA-IR as predictors of GA, only HbA1c ( $\beta$ -coefficient: 0.04;  $P=0.038$ ) and HOMA- $\beta$  ( $\beta$ -coefficient: -0.01;  $P < 0.0001$ ) were able to predict GA levels ( $r^2=0.26$ ;  $P < 0.001$  for the model).

## DISCUSSION

The main finding of this study is that GA was associated to insulin resistance and, particularly, to  $\beta$ -cell secretory function in subjects with low-grade metabolic disturbances. This implies that GA could be considered a marker of  $\beta$ -cell dysfunction even in the initial stages of the disease. The cohort of patients included in this study was of particular interest because they represented the target for specific interventions to prevent the onset of diabetes, and, in turn, to control long-term complications associated to hyperglycemia exposure. In non-diabetic subjects from the ARIC study, GA showed similar associations with traditional risk factors, including older age, family history of diabetes, and black ethnicity, in comparison to common measures of hyperglycemia, supporting its value as a marker of the metabolic alterations resulting in the loss of glycemic control (24). Moreover, GA showed a good sensitivity for prediabetes in non-obese African immigrants living in the USA, considered a population at high cardio-metabolic risk (25).

In our study, the association of GA with other markers of glucose homeostasis was lower than the ones reported by previous studies (26, 27). This result can be explained with the low prevalence of prediabetes (6.4%) observed in the sample population according to 2h-PG and the low prevalence of high FPG and HbA1c.

In the present study, GA was also associated to insulin resistance,  $\beta$ -cells dysfunction and BMI. Interestingly, HbA1c did not show similar associations. Both insulin resistance and  $\beta$ -cells dysfunction can be observed in prediabetes (2), defined as IFG or IGT, which is associated to a significant increase of the risk of diabetes (28). Nevertheless, it is reasonable that such risk might be present also when glucose concentration is within reference range, indicating that metabolic abnormalities might arise before the glycemic control is impaired. In the Whitehall II study, a prospective study conducted on a large middle-aged, metabolically healthy population, Tabak et al demonstrated that HOMA  $\beta$ -cell function decreased in a linear fashion, increasing between years 4 and 3 before the diagnosis of diabetes and then decreasing rapidly (29). This multistage model for the pathogenesis of the disease is in agreement with the hypothesis that a metabolic impairment characterized by  $\beta$ -cell dysfunction and transient impaired glycemic control occur before the onset of a stable postprandial or fasting hyperglycemia, both considered diagnostic criteria for the disease (20, 30). Moreover, it is known that metabolic alterations leading to diabetes can be considered as a continuum spectrum from normal glucose homeostasis to diabetes (29). In light of this view, a marker that can detect rapid fluctuation of

plasma glucose before the onset of the disease, is appealing. Our results demonstrated that the reduction of HOMA- $\beta$  is associated to an increase of GA, also in subjects with no significant alteration of FPG and 2h-PG. It can be hypothesized that in this prodromic state of the disease, the reduction of  $\beta$ -cell function might cause small fluctuations of plasma glucose allowing the glycation of some circulating proteins. Non-enzymatic glycation of albumin occurs 9- to 10-fold higher than other plasma proteins and, specifically, 4.5-fold higher than hemoglobin (31, 32) and it has been associated to a higher glycemic variability in diabetic patients (33, 34). Notably, HbA1c was not associated to  $\beta$ -cell dysfunction nor in the present study nor in a previous report (18). These results can be explained with the lower rate of glycation of hemoglobin in comparison to albumin and its reduced ability to reflect small glycemic excursions.

The negative association between GA and  $\beta$ -cell function has been documented in diabetic patients (18, 35, 36). It has been demonstrated that post-prandial hyperglycemia represents a different clinical phenotype from the fasting hyperglycemia (37), being the former the first sign of metabolic imbalance in the natural history of the disease. In light of this view, the confirmation of this finding in subjects at different stage of the metabolic impairment that prelude the disease could strengthen the associations between GA and markers of insulin resistance and  $\beta$ -cell function.

In our study, a negative association between GA and BMI was documented, confirming similar findings of previous studies. Indeed, GA was negatively correlated to BMI in both non-diabetic and diabetic patients (24, 25, 15, 38, 39), although the exact mechanism underlying this unexpected relationship remains unclear. It has been proposed that the chronic subclinical inflammation that characterizes overweight and obesity could also cause an increase of albumin turnover, thus reducing its glycation rate. Nevertheless, in our study BMI was not correlated to plasma albumin, suggesting that the correlation between GA and BMI is independent from the albumin plasma concentration. Further investigations are required to clarify the complex relationship between GA and BMI.

In conclusion, GA is negatively associated to peripheral insulin resistance and reduced  $\beta$ -cell secretory function in subjects with a low-grade metabolic imbalance. It has already been demonstrated that GA could help in the management of diabetic patients, especially in the short-term control of hypoglycemic therapy. Moreover, GA demonstrated good diagnostic accuracy in diabetes diagnosis, suggesting a role also in the diagnosis of the disease and, potentially, providing the opportunity to overcome the limitations of more complex diagnostic tests such as OGTT. Finally, GA can be considered a marker of reduced  $\beta$ -cell secretory function in the prodromic metabolic impairment considered at high risk of developing diabetes.

## CONFLICTS OF INTERESTS

None.

## REFERENCES

- Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, et al. The time is right for a new classification system for diabetes: rationale and implications of the  $\beta$ -cell-centric classification schema. *Diabetes Care* 2016;39:179-86.
- Ferrannini E, Gastaldelli A, Iozzo P. Pathophysiology of prediabetes. *Med Clin North Am* 2011;95:327-39.
- Cersosimo E, Solis-Herrera C, Trautmann ME, et al. Assessment of pancreatic  $\beta$ -cell function: review of methods and clinical applications. *Curr Diabetes Rev* 2014;10:2-42.
- Chen L, Cheng CY, Choi H, et al. Plasma Metabonomic Profiling of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 2016;65:1099-108.
- Tuttolomondo A, La Placa S, Di Raimondo D, et al. Adiponectin, resistin and IL-6 plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlations with clinical variables and cardiovascular co-morbidity. *Cardiovasc Diabetol* 2010;9:50.
- Olivera Santa-Catalina M, Redondo PC, Cantonero C, et al. New insights into adipokines as potential biomarkers for type-2 diabetes mellitus. *Curr Med Chem* 2017. doi: 10.2174/0929867325666171205162248.
- Hopper I, Billah B, Skiba M, et al. Prevention of diabetes and reduction in major cardiovascular events in studies of subjects with prediabetes: meta-analysis of randomised controlled clinical trials. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011;18:813-23.
- Karam JG, McFarlane SI. Update on the prevention of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2011;11:56-63.
- Ciaccio M, Bivona G, Bellia C. Therapeutical approach to plasma homocysteine and cardiovascular risk reduction. *Ther Clin Risk Manag* 2008;4:219-24.
- Bellia C, Bivona G, Scazzone C, et al. Association between homocysteinemia and metabolic syndrome in patients with cardiovascular disease. *Ther Clin Risk Manag* 2007;3:999-1001.
- Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, et al. Review: glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta* 2013;425:64-76.
- Bellia C, Zaninotto M, Cosma C, et al. Definition of the upper reference limit of glycated albumin in blood donors from Italy. *Clin Chem Lab Med* 2017;56:120-5.
- Hsu P, Ai M, Kanda E, et al. A comparison of glycated albumin and glycosylated hemoglobin for the screening of diabetes mellitus in Taiwan. *Atherosclerosis* 2015;242:327-33.
- Lu JM, Ji LN, Li YF, et al. Glycated albumin is superior to glycated hemoglobin for glycemic control assessment at an early stage of diabetes treatment: a multicenter, prospective study. *J Diabetes Complications* 2016;30:1609-13.
- Wu WC, Ma WY, Wei JN, et al. Serum Glycated Albumin to Guide the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *PLoS One* 2016;11:e0146780.
- Furusyo N, Koga T, Ai M, et al. Utility of glycated albumin for the diagnosis of diabetes mellitus in a Japanese population study: results from the Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS). *Diabetologia* 2011;54:3028-36.
- Bellia C, Zaninotto M, Cosma C, et al. Clinical usefulness of glycated albumin in the diagnosis of diabetes: results from an Italian study. *Clin Biochem* 2018. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.02.017.
- Koga M, Hirata T, Kasayama S, et al. Body mass index negatively regulates glycated albumin through insulin secretion in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2015;438:19-23.
- Hirata T, Koga M, Kasayama S, et al. Glycated albumin is not significantly correlated with body mass index in patients with acute-onset type 1 diabetes. *Clin Chim Acta* 2015;438:248-51.
- American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2017;40:S11-S24.
- Maesa JM, Fernández-Riejos P, Mora CS, et al. Evaluation of Bio-Rad D-100 HbA1c analyzer against Tosoh G8 and Menarini HA-8180V. *Pract Lab Med* 2016;5:57-64.
- Levey AS, Stevens LA. Estimating GFR using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation: more accurate GFR estimates, lower CKD prevalence estimates, and better risk predictions. *Am J Kidney Dis* 2010;55:622-7.
- Takei I, Hoshino T, Tominaga M, et al. Committee on Diabetes Mellitus Indices of the Japan Society of Clinical Chemistry-recommended reference measurement procedure and reference materials for glycated albumin determination. *Ann Clin Biochem* 2016;53:124-32.
- Poon AK, Juraschek SP, Ballantyne CM, et al. Comparative associations of diabetes risk factors with five measures of hyperglycemia. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2014;2:e000002.
- Sumner AE, Duong MT, Bingham BA, et al. Glycated Albumin Identifies Prediabetes Not Detected by Hemoglobin A1c: The Africans in America Study. *Clin Chem* 2016;62:1524-32.
- Ikezaki H, Furusyo N, Ihara T, et al. Glycated albumin as a diagnostic tool for diabetes in a general Japanese population. *Metabolism* 2015;64:698-705.
- Ma XJ, Pan JM, Bao YQ, et al. Combined assessment of glycated albumin and fasting plasma glucose improves the detection of diabetes in Chinese subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37:974-9.
- Tabák AG, Herder C, Rathmann W, et al. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet* 2012;379:2279-90.
- Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, et al. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet* 2009;373:2215-21.
- WHO. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus: abbreviated report of a WHO Consultation. World Health Organization, 2011. Available from [http://www.who.int/diabetes/publications/report-hba1c\\_2011.pdf](http://www.who.int/diabetes/publications/report-hba1c_2011.pdf) (last access: April 2018).
- Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, et al. Advantages and pitfalls of fructosamine and glycated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 2015;9:169-76.
- Ueda Y, Matsumoto H. Recent topics in chemical and clinical research on glycated albumin. *J Diabetes Sci Technol* 2015;9:177-82.
- Koga M, Murai J, Morita S, et al. Comparison of annual variability in HbA1c and glycated albumin in patients with type 1 vs. type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2013;27:211-3.
- Ogawa A, Hayashi A, Kishihara E, et al. New indices for predicting glycaemic variability. *PLoS One* 2012;7:e46517.
- Kim D, Kim KJ, Huh JH, et al. The ratio of glycated albumin to glycated haemoglobin correlates with insulin secretory function. *Clin Endocrinol* 2012;77:679-83.

36. Saisho Y, Tanaka K, Abe T, et al. Glycated albumin to glycated hemoglobin ratio reflects postprandial glucose excursion and relates to beta cell function in both type 1 and type 2 diabetes. *Diabetol Int* 2011;2:146-53.
37. Farch K, Witte DR, Tabak AG, et al. Trajectories of cardiometabolic risk factors before diagnosis of three subtypes of type 2 diabetes: a post-hoc analysis of the longitudinal Whitehall II cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013;1:43-51.
38. Miyashita Y, Nishimura R, Morimoto A, et al. Glycated albumin is low in obese, type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;78:51-5.
39. Koga M, Otsuki M, Matsumoto S, et al. Negative association of obesity and its related chronic inflammation with serum glycated albumin but not glycated hemoglobin levels. *Clin Chim Acta* 2007;378:48-52.

## Valutazione dei valori di emoglobina glicata in presenza di anemia sideropenica: risultati di uno studio retrospettivo osservazionale

Jari Intra, Giuseppe Limonta, Fabrizio Cappellini, Maria Bertona, Paolo Brambilla

Unità Operativa Complessa Laboratorio Analisi, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Monza e Brianza, Presidio Ospedaliero di Desio

### ABSTRACT

**Glycated haemoglobin values in subjects affected by iron deficiency anaemia.** Several studies suggest an association between iron deficiency anaemia and higher glycated haemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) levels, but the results are conflicting and the matter is still under debate. We conducted a retrospective case-control study to investigate the effects of iron deficiency on HbA<sub>1c</sub> levels in subjects with iron deficiency anaemia. Laboratory data were collected from a sample of individuals consecutively assessed from January 2000 to November 2016 in the Hospital of Desio, Lombardia, Italia. All non-pregnant subjects aged >12 years with one HbA<sub>1c</sub> measurement, a complete blood count, fasting blood glucose, and ferritin values within the same blood collection were enrolled for the study. A total of 2,831 subjects met the study criteria. Eighty-six individuals were diagnosed as affected by iron deficiency anaemia, while 2,745 had normal iron, ferritin, and hemoglobin values. The adjusted mean of HbA<sub>1c</sub> was significantly higher in subjects with iron deficiency anaemia (37,37 mmol/mol [5,59%]), compared to the one measured in individuals without anaemia (34,81 mmol/mol [5,34 %]) ( $p < 0,0001$ ). Our results confirm that iron deficiency anaemia affects the levels of HbA<sub>1c</sub>, significantly increasing them.

### INTRODUZIONE

Le proteine glicate sono importanti per il monitoraggio dei livelli glicemici nei pazienti affetti da diabete mellito (DM) (1, 2). L'emoglobina glicata, la cui principale forma è l'emoglobina A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) (3), è l'indicatore clinico più conosciuto e utilizzato per il monitoraggio del controllo glicemico a lungo termine e dal 2011 è stata inserita dall'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) fra i criteri per la diagnosi del DM (2). L'emoglobina glicata si forma da una reazione spontanea tra una molecola di glucosio e il residuo amminoacidico di valina in posizione N-terminale di entrambe le catene  $\beta$  della molecola dell'emoglobina (3). Una volta avvenuta la reazione, l'emoglobina rimane stabile e l'emoglobina glicata così prodotta risulta quindi proporzionale alle concentrazioni plasmatiche di glucosio, rispecchiando il livello medio di glucosio nei precedenti 2-3 mesi (4). Tuttavia, i valori di HbA<sub>1c</sub> sono influenzati sia da condizioni patologiche, come l'anemia emolitica (5) e le emoglobinopatie (6) sia da altre condizioni, quali la gravidanza (7), la carenza di vitamina B12, di acido folico e di ferro (8-13), causando possibili non corrette interpretazioni dei risultati. È stato anche dimostrato che la durata della vita dei globuli

rossi può influenzare i valori di HbA<sub>1c</sub> (14-16). L'anemia sideropenica è l'anemia più frequente e colpisce 1,6 miliardi di persone in tutto il mondo (17). In letteratura, sono presenti diversi lavori che hanno analizzato l'effetto dell'anemia sideropenica sui valori di HbA<sub>1c</sub> (12). Alcuni studi hanno evidenziato che i pazienti affetti da anemia da carenza di ferro, sia diabetici sia non diabetici, presentano livelli più elevati di HbA<sub>1c</sub>, e che, dopo trattamento con ferro, tali valori diminuiscono (18-19). Al contrario, altri lavori hanno riportato che in pazienti anemici sideropenici non diabetici, i valori di HbA<sub>1c</sub> non presentano variazioni quantitative significative (9, 20). Infine, Sinha N et al. hanno osservato che i valori di HbA<sub>1c</sub> nei soggetti con anemia sideropenica erano significativamente inferiori rispetto ai valori di HbA<sub>1c</sub> del gruppo di soggetti sani (11). Considerato il ruolo chiave di HbA<sub>1c</sub> nella diagnosi del DM e l'ampia diffusione dell'anemia sideropenica sia nei paesi in via di sviluppo che in quelli sviluppati, lo scopo di questo studio è stato quello di verificare la relazione tra anemia sideropenica e HbA<sub>1c</sub> partendo dall'archivio dei dati disponibile presso il laboratorio analisi dell'Ospedale di Desio (Lombardia, Italia).

Correspondence to: Jari Intra, U.O.C. Laboratorio analisi, A.S.S.T. Monza e Brianza, P.O. Desio, Via Mazzini 1, 20832 Desio (MB). Tel. 0362383296, Fax 0362383464, E-mail: jari.intra@unimi.it

Ricevuto: 05.03.2018

Revisionato: 26.04.2018

Accettato: 03.05.2018

Pubblicato on-line: 06.06.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.036

**MATERIALI E METODI**

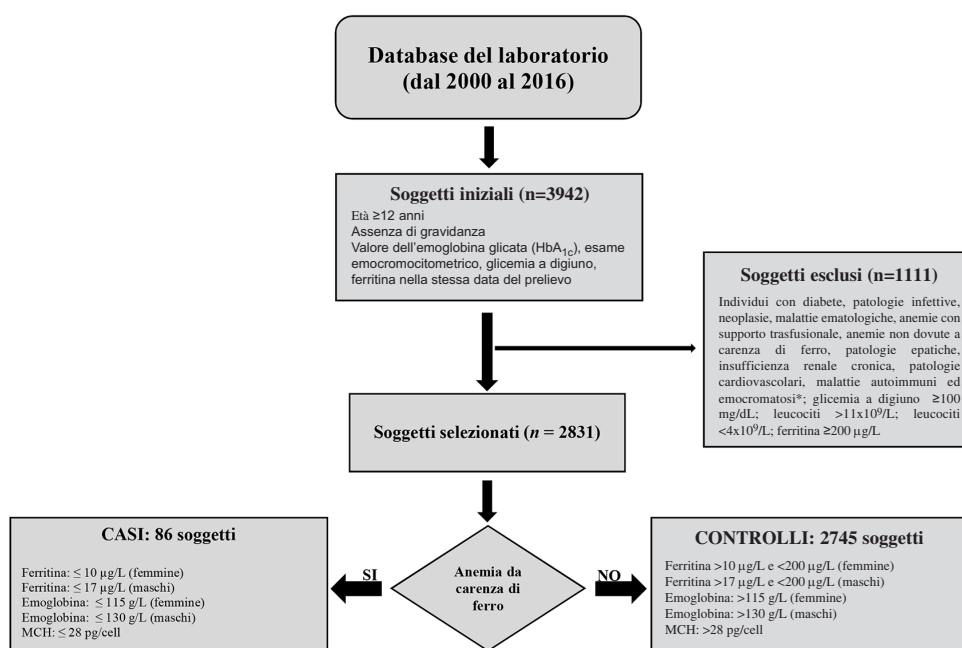
**Popolazione studiata**

Partendo dal database del laboratorio dell’Ospedale di Desio, abbiamo realizzato uno studio retrospettivo monocentrico, prendendo in considerazione i dati di pazienti che si sono rivolti alla struttura ospedaliera da Gennaio 2000 a Novembre 2016. Inizialmente, i criteri di selezione dei soggetti da includere nello studio sono stati i seguenti: età >12 anni (21), assenza di gravidanza, determinazione, nella stessa data, di HbA<sub>1c</sub>, esame emocromocitometrico, glucosio plasmatico a digiuno e ferritina. Nella seconda fase, per escludere i casi di leucopenia o di infezione, sono stati esclusi i soggetti con numero di leucociti <4x10<sup>9</sup>/L e >11x10<sup>9</sup>/L e ferritina >200 µg/L. Inoltre, sono stati esclusi i pazienti con livelli di glicemia a digiuno >100 mg/dL; in base alle diagnosi secondo la classificazione internazionale ICD-9-CM, sono stati inoltre esclusi tutti i soggetti affetti da DM, malattie infettive, neoplasie, malattie ematologiche, anemie con supporto trasfusionale, anemie non dovute a carenza di ferro, malattie epatiche, insufficienza renale cronica, malattie cardiovascolari, disordini autoimmuni ed emocromatosi. I soggetti rimasti sono stati quindi suddivisi in due gruppi sulla base dei seguenti criteri: individui con anemia sideropenica (denominati casi) con ferritina ≤10 µg/L (se femmina) o ≤17 µg/L (se maschio) (22), emoglobina (Hb) ≤115 g/L (se femmina) (23) o ≤130 g/L (se maschio) e concentrazione media dell’emoglobina (MCH) ≤28 pg/cellula; soggetti non anemici (denominati

controlli) con ferritina tra 10 e 200 µg/L (se femmina) o tra 17 e 200 µg/L (se maschio), emoglobina >115 g/L (se femmina) o >130 g/L (se maschio) e MCH >28 pg/cellula. Il percorso seguito per la selezione dei casi e dei controlli è rappresentato in Figura 1.

**Analisi di laboratorio**

I valori di HbA<sub>1c</sub> sono stati ottenuti utilizzando lo strumento ARKRAY ADAMS A1c HA-8160 (Menarini Diagnostics, Firenze, Italia) basato sulla cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). I coefficienti di variazione (CV) registrati sono stati i seguenti; intra serie: 0,6% e 0,7% per i controlli basso e alto, rispettivamente; inter-serie: 0,5% e 0,6% per i controlli basso e alto, rispettivamente. I valori di emoglobina, contenuto corpuscolare medio di emoglobina (MCH), concentrazione corpuscolare media dell’emoglobina (MCHC), volume medio corpuscolare (MCV), ematocrito, conteggio degli eritrociti e dei leucociti, e la formula leucocitaria sono stati ottenuti con lo strumento automatico Sysmex XE 2100 (Sysmex, Germania). Tutte le determinazioni sono state eseguite su campioni di sangue intero raccolti in provette sottovuoto contenenti EDTA come anticoagulante. Per la misura della ferritina è stato utilizzato un test immunologico in elettrochemiluminescenza (ECLIA) (Roche Diagnostics, Germania), mentre i valori di glucosio sono stati ottenuti con metodo enzimatico (Roche Diagnostics, Germania). Queste misure sono state eseguite utilizzando lo strumento Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Germania). Tutte le determinazioni sono state eseguite su campioni



**Figura 1**  
Diagramma di flusso per la selezione dei soggetti in studio.

\*Le diagnosi sono in accordo con la classificazione internazionale delle malattie (ICD-9-CM).

di plasma ottenuto dopo centrifugazione del sangue intero raccolto in provette sottovuoto contenenti litioeparina come anticoagulante.

### Analisi statistica

Per l'analisi statistica è stato usato il software SAS (versione 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). I dati della variabile in studio ( $HbA_{1c}$ ) sono stati analizzati usando una procedura di SAS, denominata PROC General Linear Model, per l'esecuzione dell'analisi della varianza secondo un modello lineare generale includendo come termini i due gruppi, casi e controlli, e come covariate l'età, l'anno e il mese al momento del prelievo, il sesso e il valore della glicemia a digiuno (24). Abbiamo applicato una trasformazione in scala logaritmica in base 10 dei valori di  $HbA_{1c}$  per approssimarli alla distribuzione normale e alla omoschedasticità; i dati dell'età, l'anno e il mese al momento del prelievo, il sesso e il valore della glicemia a digiuno non hanno avuto necessità di trasformazione di scala. I risultati di  $HbA_{1c}$  sono stati infine riconvertiti in antilogaritmo, ottenendo così le medie sia in valore assoluto (mmol/mol) che in percentuale (%). Inoltre, secondo il principio di Bonferroni, è stato utilizzato un rischio di confronto pari a 0,05. Per confrontare i parametri ematologici e biochimici dei due gruppi è stato utilizzato il test *t* di student. Un valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

### RISULTATI

Nella prima fase di selezione sono stati recuperati dal database del laboratorio dell'Ospedale di Desio i

dati di 3942 soggetti selezionati secondo i criteri presentati in Figura 1. Di questo gruppo iniziale, 1111 individui sono stati esclusi dallo studio perché presentavano una delle seguenti condizioni: glicemia a digiuno  $>100$  mg/dL, ferritina  $>200$   $\mu$ g/L, leucopenia (leucociti  $<4 \times 10^9/L$ ), leucocitosi (leucociti  $>11 \times 10^9/L$ ), diabete, malattie infettive, neoplasie, patologie ematologiche, anemie non dovute a carenza di ferro, patologie epatiche, insufficienza renale cronica, patologie cardiovascolari, disordini autoimmuni ed emocromatosi. La popolazione finale in studio è pertanto composta da 2831 individui, di cui 1508 (53%) maschi e 1323 (47%) femmine. I parametri ematologici e biochimici dei partecipanti sono riassunti nella Tabella 1. I soggetti con anemia sideropenica sono 86 (casi), mentre 2745 soggetti hanno un quadro clinico di non anemia (controlli). Tra gli individui anemici, la carenza di ferro è prevalente nel genere femminile, con un rapporto di 3,09 a 1. Inoltre, come previsto, sono presenti differenze nei valori medi dei parametri ematologici e biochimici relativi ai soggetti anemici sideropenici rispetto ai non anemici ( $p < 0,0001$ ). Infatti, i valori di emoglobina, ematocrito, eritrociti, MCV, MCH, MCHC e ferritina sono inferiori in modo statisticamente significativo nei soggetti affetti da anemia sideropenica ( $p < 0,0001$ ) (Tabella 1). Non sono presenti differenze significative tra le medie dei valori di glicemia plasmatica a digiuno dei due gruppi ( $p=0,15$ ).

I valori delle medie e i valori delle medie aggiustate per le covariate età, anno e mese al momento del prelievo, sesso e valore della glicemia a digiuno, e di  $HbA_{1c}$  hanno mostrato differenze significative nei soggetti appartenenti al gruppo dei casi rispetto a quelli

**Tabella 1**

*Caratteristiche ematologiche e biochimiche dei soggetti in studio*

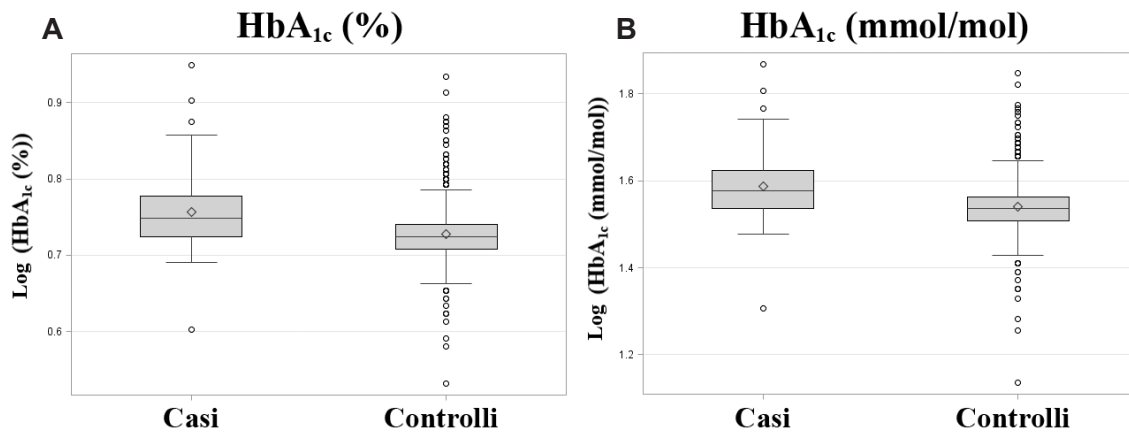
	Casi <sup>a</sup> (n=86)		Controlli <sup>b</sup> (n=2745)		p <sup>c</sup>
	Maschi	Femmine	Maschi	Femmine	
Numero (n)	21	65	1487	1258	
Età, anni [mediana (5°-95° percentile)]	43 (24-83)	44 (24-85)	43 (20-74)	43 (20-73)	
<b>Variabili</b>					
Emoglobina (g/L), media (DS)	104 (13)	103 (14)	152 (9)	135 (9)	<0,0001
Ematocrito (%), media (DS)	33,0 (3,5)	32,7 (3,7)	43,7 (2,4)	39,9 (2,5)	<0,0001
MCV (fL), media (DS)	76,5 (7,1)	76,4 (7,0)	86,9 (3,5)	88,4 (3,5)	<0,0001
MCH (pg/cell), media (DS)	24,0 (3,0)	24,0 (2,9)	30,2 (1,2)	30,0 (1,2)	<0,0001
MCHC (g/dL), media (DS)	31,4 (1,4)	31,2 (1,5)	34,7 (1,0)	33,9 (0,9)	<0,0001
Eritrociti ( $\times 10^{12}/L$ ), media (DS)	4,33 (0,46)	4,31 (0,50)	5,03 (0,32)	4,51 (0,31)	<0,0001
Leucociti ( $\times 10^9/L$ ), media (DS)	6,56 (1,75)	6,52 (1,81)	6,02 (0,83)	6,31 (1,06)	0,0674
Glicemia a digiuno (mg/dL), media (DS)	88,0 (9,2)	88,0 (9,4)	85,0 (9,1)	85,0 (9,0)	0,1526
Ferritina ( $\mu$ g/L), mediana (5° e 95° percentile)	11 (7-16)	5 (3-10)	66 (24-169)	40 (14-121)	<0,0001

<sup>a</sup>Casi, pazienti con anemia sideropenica.

<sup>b</sup>Controlli, pazienti non anemici.

<sup>c</sup>p: valori ottenuti dal confronto tra Casi e Controlli.

DS, deviazione standard; MCV, volume corpuscolare medio; MCH, contenuto corpuscolare medio; MCHC, concentrazione media corpuscolare di emoglobina.

**Figura 2**

Box-plots di  $HbA_{1c}$  (%) e  $HbA_{1c}$  (mmol/mol) tra casi (pazienti con anemia sideropenica) e controlli (pazienti non anemici). La linea interna rappresenta la mediana della distribuzione. Le linee della base inferiore e superiore rappresentano il primo e il terzo quartile (25<sup>mo</sup> e 75<sup>mo</sup> percentile). La media dei valori di  $HbA_{1c}$  (%) e  $HbA_{1c}$  (mmol/mol) dei casi e controlli è indicata con  $\diamond$ .

**Tabella 2**

Confronto dei valori di  $HbA_{1c}$  nei due gruppi

	Casi <sup>a</sup>	Controlli <sup>b</sup>	p <sup>c</sup>
Soggetti (n)	86	2745	
<b><math>HbA_{1c}</math> (%)</b>			<0,0001
Media <sup>d</sup>	5,71	5,34	
Media $\pm$ DS <sup>d</sup>	5,07-6,42	5,02-5,68	
Media aggiustata <sup>e</sup>	5,59	5,34	
Media aggiustata $\pm$ ES	5,56-5,63	5,33-5,35	
<b><math>HbA_{1c}</math> (mmol/mol)</b>			<0,0001
Media <sup>d</sup>	38,64	34,78	
Media $\pm$ DS <sup>d</sup>	32,09-46,53	31,34-38,59	
Media aggiustata <sup>e</sup>	37,37	34,81	
Media aggiustata $\pm$ ES	36,99-37,76	34,75-34,88	

<sup>a</sup>Casi: pazienti anemici.

<sup>b</sup>Controlli: pazienti non anemici.

<sup>c</sup>p: valore ottenuto dall'analisi dei dati aggiustando per le covariate età, anno e mese al momento del prelievo, sesso e valore della glicemia a digiuno.

<sup>d</sup>Valori derivati dalla trasformazione di scala log ( $HbA_{1c}$  (%) e  $HbA_{1c}$  (mmol/mol)) non aggiustati.

<sup>e</sup>Valori derivati dalla trasformazione di scala log ( $HbA_{1c}$  (%) e  $HbA_{1c}$  (mmol/mol)) aggiustati.

DS, deviazione standard; ES, errore standard.

dei controlli (Figura 2, Tabella 2). Infatti, negli individui affetti da anemia sideropenica i valori di  $HbA_{1c}$  sono più elevati (37,37 mmol/mol [5,59%]) rispetto a quelli misurati negli individui senza anemia (34,81 mmol/mol [5,34%]) (p < 0,0001) (Figura 2, Tabella 2).

## DISCUSSIONE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) raccomanda di utilizzare la determinazione di  $HbA_{1c}$  per la diagnosi del diabete di tipo 2, data la sua elevata

riproducibilità e la dimostrata correlazione con le complicanze legate a tale patologia (25). Tuttavia, un gran numero di fattori, quali età, etnia, ereditarietà e numerose patologie, possono influenzare i valori di  $HbA_{1c}$  (1, 20, 26). L'anemia è una delle patologie che più influisce sui livelli di  $HbA_{1c}$ ; molti sforzi sono stati impiegati per indagare il fenomeno, che in alcuni casi è dipendente dal tipo di anemia (11, 27). L'anemia emolitica, l'emorragia acuta e le emoglobinopatie sono patologie che influenzano negativamente i valori misurati di  $HbA_{1c}$ , determinandone una sottostima (27).

L'insufficienza renale cronica influenza sia negativamente che positivamente i valori di HbA<sub>1c</sub> (27). L'anemia sideropenica è stata dimostrata essere un fattore che può influenzare i valori di HbA<sub>1c</sub> nei pazienti diabetici come pure in soggetti non diabetici producendo sia sovra che sottostima (29-32). In questo lavoro abbiamo voluto verificare quale potesse essere l'effetto dell'anemia dovuta a carenza di ferro sui valori di HbA<sub>1c</sub> in soggetti non diabetici partendo dall'analisi dei dati presenti in un ampio database. I nostri risultati hanno mostrato che i soggetti non diabetici con anemia sideropenica presentano valori significativamente più alti di HbA<sub>1c</sub> rispetto a quelli di individui non anemici. Questi dati sono in accordo con quelli ottenuti in altri studi, in cui si è dimostrato che l'anemia da carenza di ferro provoca misurazioni sovrastimate di HbA<sub>1c</sub> (9, 33-36). Il meccanismo esatto alla base di questo effetto non è ancora noto. Sono state tuttavia proposte due ipotesi. Nella prima si suppone che la carenza di ferro alteri la durata della vita degli eritrociti, determinando la presenza di una popolazione più anziana di emazie che rimangono quindi più a lungo a contatto con il glucosio plasmatico, con un conseguente valore falsamente più elevato di HbA<sub>1c</sub> (37). Una seconda ipotesi, più recente, suppone un'associazione tra processi di glicazione non enzimatici e stress ossidativo (38-39). Negli stati patologici di deficit di ferro, gli enzimi coinvolti nel sistema di difesa antiossidante sono funzionalmente limitati, e si osserva un concomitante aumento della perossidazione lipidica (38). Un biomarcatore di stress ossidativo è la malondialdeide (MDA), che viene prodotto dalla perossidazione lipidica degli acidi grassi polinsaturi (40). In uno studio recente, è stato dimostrato che in pazienti sideropenici i livelli di MDA sono più elevati rispetto a quelli misurati in un gruppo di controllo (38). È stato verificato *in vitro* che i valori di HbA<sub>1c</sub> si innalzano quando gli eritrociti vengono incubati con MDA, e tale aumento è bloccato dalla incubazione delle emazie con antiossidanti, suggerendo quindi una relazione tra la perossidazione lipidica e la glicazione non enzimatica dell'emoglobina dovuta alla MDA (38). Tre studi hanno riportato una significativa diminuzione dei valori di HbA<sub>1c</sub> dopo il trattamento di soggetti anemici con ferro, suggerendo che la carenza di ferro deve essere corretta per meglio interpretare i valori di HbA<sub>1c</sub> (31, 35, 41). Gli effetti del trattamento con ferro orale sono stati studiati anche sui marcatori dello stress ossidativo nei bambini, nei quali si è potuto osservare una diminuzione del livello di MDA (38). Se la concentrazione di MDA diminuisce, la glicazione non enzimatica dell'emoglobina tende a ridursi, limitando quindi i suoi effetti negativi sui valori di HbA<sub>1c</sub> (38).

Sinha N et al. hanno mostrato che i valori di HbA<sub>1c</sub> erano significativamente inferiori in individui sideropenici appartenenti ad uno stato socio-economico basso rispetto a quelli misurati in soggetti non anemici; dopo trattamento con ferro, nei soggetti anemici i livelli di HbA<sub>1c</sub> aumentavano rispetto ai valori iniziali, suggerendo che un'insufficienza nutrizionale generale potrebbe essere un importante fattore di rischio di

alterazione dei livelli di HbA<sub>1c</sub> oltre che indurre carenza di ferro (11).

Il limite del nostro lavoro è derivato dall'essere uno studio retrospettivo monocentrico. L'arruolamento di un numero maggiore di individui con anemia sideropenica sarà utile per migliorare l'accuratezza del rapporto tra anemia sideropenica e HbA<sub>1c</sub>, valutando anche l'effetto della correzione della sideropenia sui livelli di HbA<sub>1c</sub>.

In conclusione, il nostro studio ha evidenziato che l'anemia da carenza di ferro causa valori di HbA<sub>1c</sub> falsamente elevati. Sebbene l'aumento riscontrato dei valori di HbA<sub>1c</sub> nei soggetti anemici sideropenici rispetto a quelli dei soggetti non anemici sia di modesta entità, non può essere trascurato soprattutto quando si valutano gli individui con un valore di HbA<sub>1c</sub> vicino al valore soglia di 6,5% per il possibile rischio di classificarli erroneamente come diabetici. I nostri risultati rafforzano quindi l'idea che l'anemia sideropenica debba essere considerata nella gestione di soggetti con prediabete e diabete per i suoi effetti sui valori di HbA<sub>1c</sub>.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. The International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1327-34.
2. World Health Organization. Use of Glycated Haemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. <http://www.who.int/diabetes/en> (ultimo accesso: maggio 2018)
3. Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D, et al. What is hemoglobin A1c? An analysis of glycosylated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. *Clin Chem* 1998;44:1951-8.
4. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, et al. Diabetes mellitus. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, ed. 15. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 2001:2105-9.
5. Horton BF, Huisman TH. Studies on the heterogeneity of haemoglobin. VII. Minor haemoglobin components in haematological diseases. *Br J Haematol* 1965;11:296-304.
6. Eberentz-Lhomme C, Ducrocq R, Intrator S, et al. Haemoglobinopathies: a pitfall in the assessment of glycosylated haemoglobin by ion-exchange chromatography. *Diabetologia* 1984;27:596-8.
7. Phelps RL, Honig GR, Green D, et al. Biphasic changes in hemoglobin A1c concentrations during normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147:651-3.
8. Brooks AP, Metcale J, Day JL, et al. Iron deficiency and glycosylated haemoglobin A1. *Lancet* 1980;2:141.
9. Ford ES, Cowie CC, Li C, et al. Iron-deficiency anemia, non-iron-deficiency anemia and HbA<sub>1c</sub> among adults in the US. *J Diabetes* 2011;3:67-73.
10. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2011;57:e1-e47.
11. Sinha N, Mishra TK, Singh T, et al. Effect of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c levels. *Ann Lab Med* 2012;32:17-22.

12. English E, Idris I, Smith G, et al. The effect of anaemia and abnormalities of erythrocyte indices on HbA1c analysis: a systematic review. *Diabetologia* 2015;58:1409-21.
13. Silva JF, Pimentel AL, Camargo JL. Effect of iron deficiency anaemia on HbA1c levels is dependent on the degree of anaemia. *Clin Biochem* 2016;49:117-20.
14. Cohen RM, Franco RS, Khera PK, et al. Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c. *Blood* 2008;112:4284-91.
15. Franco RS. The measurement and importance of red cell survival. *Am J Hematol* 2009;84:109-14.
16. Khera PK, Smith EP, Lindsell CJ, et al. Use of an oral stable isotope label to confirm variation in red blood cell mean age that influences HbA1c interpretation. *Am J Hematol* 2015;90:50-5.
17. World Health Organization. Worldwide prevalence of anemia 1993-2005. [http://www.who.int/vmnis/publications/anaemia\\_prevalence/en/index.html](http://www.who.int/vmnis/publications/anaemia_prevalence/en/index.html) (ultimo accesso: maggio 2018).
18. Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. *Acta Haematol* 2004;112:126-8.
19. Il S, Rhee SY, Woo JT, et al. Hemoglobin A1c may be an inadequate diagnostic tool for diabetes mellitus in anemic subjects. *Diabetes Metab J* 2013;37:343-8.
20. Kim C, Bullard KM, Herman WH, et al. Association between iron deficiency and A1C Levels among adults without diabetes in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006. *Diabetes Care* 2010;33:780-5.
21. American Diabetes Association. Diabetes advocacy. In *Standards of Medical Care in Diabetes*. *Diabetes Care* 2017;40:S128-9.
22. Jacobs A, Miller F, Worwood M, et al. Ferritin in the Serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br Med J* 1972;4:206-8.
23. Provan D. *ABC of Clinical haematology*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2007.
24. Timm NH, Mieczkowski TA. *Generalized Linear Models: Theory and Applications using SAS Software*. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1997.
25. Gomez-Perez FJ, Aguilar-Salinsa CA, Almeda-Valdes P, et al. HbA1c for the diagnosis of diabetes mellitus in a developing country. A position article. *Arch Med Res* 2010;41:302-8.
26. Kirk JK, D'Agostino RB Jr, Bell RA, et al. Disparities in HbA1c levels between African-American and non-Hispanic white adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2006;29:2130-6.
27. Camargo JL, Gross JL. Conditions associated with very low values of glycohaemoglobin measured by an HPLC method. *J Clin Pathol* 2004;57:346-9.
28. Gallagher EJ, Le Roith D, Bloomgarden Z. Review of hemoglobin A(1c) in the management of diabetes. *J Diabetes* 2009;1:9-17.
29. Tarim O, Küçükerođan A, Günay U, et al. Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c in type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Int* 1999;41:357-62.
30. El-Agouza I, Abu Shahla A, Sirdah M. The effect of iron deficiency anaemia on the levels of haemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. *Clin Lab Haematol* 2002;24:285-9.
31. Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. *Acta Haematol* 2004;112:126-8.
32. Bae JC, Suh S, Jin SM, et al. Hemoglobin A1c values are affected by hemoglobin level and gender in non-anemic Koreans. *J Diabetes Investig* 2014;5:60-5.
33. Shanthi B, Revathy C, Manjula Devi AJ, et al. Effect of iron deficiency on glycation of haemoglobin in nondiabetics. *J Clin Diagn Res* 2013;7:15-7.
34. English E, Idris I, Smith G, et al. The effect of anaemia and abnormalities of erythrocyte indices on HbA1c analysis: a systematic review. *Diabetologia* 2015;58:1409-21.
35. Silva JF, Pimentel AL, Camargo JL. Effect of iron deficiency anaemia on HbA1c levels is dependent on the degree of anaemia. *Clin Biochem* 2016;49:117-20.
36. Grossman A, Gafter-Gvili A, Schmirovitz-Weiss H, et al. Association of glycated hemoglobin with hemoglobin levels in elderly non-diabetic subjects. *Eur J Intern Med* 2016;36:32-5.
37. Kempe DS, Lang PA, Duranton C, et al. Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *Faseb J* 2006;20:368-70.
38. Selvaraj N, Bobby Z, Sathiyapriya V. Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an in vitro study on human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2006;366:190-5.
39. Zaka-Ur-Rab Z, Adnan M, Ahmad SM, et al. Effect of oral iron on markers of oxidative stress and antioxidant status in children with iron deficiency anaemia. *J Clin Diagn Res* 2016;10:SC13-19.
40. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:316-8.
41. Gram-Hansen P, Mourits-Andersen HT, Eriksen JE, et al. Glycosylated haemoglobin (HbA1c) as an index of the age of the erythrocyte population in non-diabetic patients. *Eur J Haematol* 1990;44:201-3.

The fifth version of the Syllabus (1S) represents the EFLM position statement for the education and training of medical practitioners, scientists and pharmacists practising at specialist level in laboratory medicine across Europe. It builds on the fourth edition (2012) by detailing the knowledge requirements in clinical biochemistry/immunology, haematology/blood transfusion, microbiology/ virology/infection prevention and control, cytogenetics/molecular genetics. Stronger prominence is given to the skills required in the latest advances in analytical techniques and the use of statistical evaluations; sections on leadership have been expanded to highlight the competencies required to provide services beyond the laboratory. An outline structure for a training programme and a model for competency assessment is proposed together with expected responsibilities of trainees and trainers; reference is provided to a trainee's log book 2S. The expected outcome from such training programmes is a practitioner who:

- Provides clinical leadership in determining and directing the shape of services
- Works from best evidence to initiate tests and interpret results that aid in differential diagnosis, patient management and prognostication
- Initiates, conducts and supports research and development
- Innovates and implements new technologies
- Is responsible for safety of patients through participation in, and/or delivery of quality assurance programmes, undertaking continuous audit and evaluation, understanding of ethical, legal and governance considerations
- Participates in, and/or leads teaching, education and training programmes

A key driver for a unified European syllabus is to harmonise common education and training principles across Europe and set standards of practice. This in turn helps catalyse a more equitable delivery of laboratory medicine services within and across country borders and ensures greater patient safety. For those countries able to meet EFLM's Equivalence of Standards comes the opportunity for their specialists to join the European Register of Specialists in Laboratory Medicine. Established in 1992 for specialist practitioners in the European Union (EU), eligibility to join the register was extended to all 40 national societies affiliated to EFLM in 2018. In the absence of registration systems and regulatory frameworks, the Register acts as a forerunner charter mark of professional status that already supports individuals in many countries. Holders of the title whether medical, scientific or pharmacy trained specialists are widely recognised as practitioners with the knowledge, skills and competence to enhance laboratory's medicine's contribution to best health and best care. Joining the Register first requires EFLM-affiliated national societies to submit evidence that specialist training is conducted over a minimum 9 years training that includes EFLM recognised qualifications. This evidence provides the measure against which applications can then be assessed. Applications may be made on an individual basis but the much-preferred mechanism with minimal administrative burden on all parties is auto-registration led by the national society in which the names of all those individuals able to meet the standards are submitted to the EFLM Office. This mechanism has seen a 25% growth in the Register over the 2017/2018 with more national societies coming "on-line" during 2018.

For non-medical specialist practitioners in the European Union, the Syllabus and the Register underpin EFLM's proposed Common Training Framework, a pre-requisite for achieving recognition of specialist practice under EU Commission Directive 2013/55/EU (The Recognition of Professional Qualifications). Whilst medical staff already enjoy many aspects of free migration; there are over 600 professions across the Union for whom migration is restricted through lack of mutual recognition of qualifications. Achieving recognition under the Directive provides an international platform for the role of the specialist practitioner and the contribution of laboratory medicine towards better health and best care. For the individual, achieving recognition provides opportunities for free, unhindered professional movement across EU borders where previously compensation measures (e.g. re-training, new qualifications, aptitude tests, adaptation periods) by host states may have deterred and delayed migration. Key to presentation of a Common Training Framework to the EU Commission is the support of 10 EU member states. In this regard the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology takes a leading role in its government liaison and promotion of the specialist role and the contribution of laboratory medicine to healthcare

I take the opportunity to thank the Italian Society for the invitation to introduce the translation into Italian of the version 5 of the Syllabus, the importance of joining the Register, and EFLM's leadership role in presenting a Common Training Framework that recognises the contribution of specialist practice. The translation into national languages promotes the diffusion and the knowledge of the Syllabus and the Register, contributing greatly to the harmonization of the laboratory medicine practice across Europe.

Gilbert Wieringa  
Chair, EFLM Profession Committee

## Il Syllabus EFLM per la formazione post-laurea per specialisti in Medicina di Laboratorio: versione n 5 (2018)

Nuthar Jassam<sup>1</sup>, Jennefer Lake<sup>2</sup>, Milena Dabrowska<sup>3</sup>, Jose Queralto<sup>4</sup>, Demetrios Rizos<sup>5</sup>, Ralf Lichtinghagen<sup>6</sup>, Hannsjörg Baum<sup>7</sup>, Ferruccio Ceriotti<sup>8</sup>, John O'Mullane<sup>9</sup>, Evgenija Homšak<sup>10</sup>, Charis Charilaou<sup>11</sup>, Mats Ohlson<sup>12</sup>, Ivana Rako<sup>13</sup>, Dalius Vitkus<sup>14</sup>, Gustav Kovac<sup>15</sup>, Pauline Verschuure<sup>16</sup>, Jaroslav Racek<sup>17</sup>, Mariana Carmen Chifiriuc<sup>18</sup>, Gilbert Wieringa<sup>19</sup>

<sup>1</sup>Blood Sciences, Harrogate and District NHS Foundation Trust, Harrogate, UK

<sup>2</sup>Department of Clinical Biochemistry, Royal London Hospital, London, UK

<sup>3</sup>Department of Haematological Diagnostics, Medical University of Bialystok, Bialystok, Poland

<sup>4</sup>Clinical Biochemistry Department. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Aretaieio University Hospital, Athens, Greece

<sup>6</sup>Institute for Clinical Chemistry, Medical University Hannover, Hannover, Germany

<sup>7</sup>Institute for Laboratory Medicine, RegionaleKliniken Holding RKH GmbH, Ludwigsburg, Germany

<sup>8</sup>Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy

<sup>9</sup>Clinical Biochemistry Department, Cork University Hospital, Wilton Cork, Ireland

<sup>10</sup>Department of Laboratory Diagnostics, University Medical Centre Maribor, Maribor, Slovenia

<sup>11</sup>Biomedical lab, Nicosia, Cyprus

<sup>12</sup>Department of Clinical Chemistry, Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg, Sweden

<sup>13</sup>Department of Laboratory diagnostics, University Hospital Centre Zagreb, Croatia

<sup>14</sup>Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Vilnius University, Faculty of Medicine, Vilnius, Lithuania

<sup>15</sup>Institute of Laboratory Medicine, Slovak Medical School, Bratislava, Slovakia

<sup>16</sup>Clinical Laboratory, St. Anna Hospital, Geldrop, the Netherlands

<sup>17</sup>Department of Clinical Biochemistry and Haematology, University Hospital, Pilsen, Czech Republic

<sup>18</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Research Institute of the University of Bucharest, Romania, CALILAB Romania

<sup>19</sup>Laboratory Medicine, Bolton NHS Foundation Trust, Bolton, UK

Traduzione a cura di Maria Sole Cigoli (Milano) e Bruna Lo Sasso (Palermo)

### ABSTRACT

**The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine syllabus for postgraduate education and training for Specialists in Laboratory Medicine: version 5 – 2018.** Although laboratory medicine practise varies across the European Union's (EU) member states, the extent of overlap in scope is such that a common syllabus describing the education and training associated with high-quality, specialist practise can be identified. In turn, such a syllabus can help define the common set of skills, knowledge and competence in a Common Training Framework (CTF) for non-medical Specialists in Laboratory Medicine under EU Directive 2013/55/ EU (The recognition of Professional Qualifications). In meeting the requirements of the directive's CTF patient safety is particularly enhanced when specialists seek to capitalise on opportunities for free professional migration across EU borders. In updating the fourth syllabus, the fifth expands on individual discipline requirements, new analytical techniques and use of statistics. An outline structure for a training programme is proposed together with expected responsibilities of trainees and trainers; reference is provided to a trainee's log book. In updating the syllabus, it continues to support national programmes and the aims of EU Directive 2013/55/EU in providing safeguards to professional mobility across European borders at a time when the demand for highly qualified professionals is increasing in the face of a disparity in their distribution across Europe. In support of achieving a CTF, the syllabus represents EFLM's position statement for the education and training that underpins the framework.

*Questo articolo è la traduzione di The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Syllabus for postgraduate education and training for Specialists in Laboratory Medicine: version 5 – 2018 doi.org/10.1515/cclm-2018-0344. La versione originale è disponibile come materiale supplementare (1S).*

Ricevuto: 05.07.2018

Accettato: 05.07.2018

Pubblicato on-line: 26.07.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.044

## INTRODUZIONE

Un Syllabus è un piano che include i contenuti e/o i testi da utilizzare in un determinato corso di studi, in particolare in quei percorsi di formazione che si concludono con l'espletamento di un esame finale (1).

Qualora si evidenzino una sostanziale similitudine tra piani di studi differenti, esiste l'opportunità di armonizzare i principi comuni di istruzione e formazione.

La trasposizione della Direttiva dell'Unione Europea 2013/55/EC (2) (Il Riconoscimento delle Qualificazioni Professionali) nelle leggi nazionali degli Stati membri nel gennaio 2016, ha evidenziato che, sebbene esista la richiesta di professionisti altamente qualificati in tutta l'Unione Europea (UE), vi è una eterogeneità nella loro distribuzione (3).

Per creare una procedura che permetta il reciproco riconoscimento delle qualifiche professionali, la Direttiva:

- sostiene i professionisti che desiderano spostarsi liberamente e senza ostacoli attraverso i confini dell'UE;
- promuove una distribuzione più equa delle risorse umane e dei servizi in tutta l'UE;
- può ovviare alla necessità che gli Stati membri impongano misure di compensazione (ad esempio nuova formazione, nuove qualifiche, test attitudinali, periodi di adattamento) ad ogni professionista, misure che potrebbe ritardare o scoraggiare la circolazione.

Mentre le professioni settoriali (ad esempio medici, infermieri e ostetriche) già godono di molte condizioni favorevoli relative alla libera circolazione, vi sono oltre 600 professioni in tutta l'UE per le quali la circolazione è limitata a causa della mancanza di un riconoscimento reciproco delle qualifiche.

Riconoscendo che occorre salvaguardare le norme per garantire la tutela dei consumatori e della salute delle persone negli Stati ospitanti/di destinazione, la Direttiva consente agli Stati membri di stabilire un insieme comune di conoscenze, capacità e competenze, necessarie per esercitare una determinata professione, attraverso l'introduzione di Percorsi Comuni di Formazione (denominati "Common Training Frameworks", CTFs). I professionisti che hanno conseguito le loro qualifiche nell'ambito di un CTF, potranno essere automaticamente riconosciuti senza che vengano imposte ulteriori misure di compensazione (per esempio, periodi di adattamento o test attitudinali).

Nel proporre un CTF per Specialisti in Medicina di Laboratorio non medici, un elemento costitutivo di base è un Syllabus rappresentativo e aggiornato che delinei le abilità specialistiche, le conoscenze e le competenze necessarie per dirigere i servizi di medicina di laboratorio. Riconoscendo che un CTF non sostituisce i programmi nazionali per l'istruzione e la formazione (a meno che uno Stato membro non decida diversamente nell'ambito della propria legge nazionale) viene riconosciuto che la sovrapposizione in campo pratico sia sufficientemente ampia da consentire di delineare un programma comune quale posizione di EFLM per l'insegnamento e la formazione. Mentre la quarta versione del Syllabus (4) si

basa sulle abilità, sulle conoscenze e sulle competenze generiche dello specialista, la quinta versione include i requisiti relativi alle singole discipline: chimica clinica/immunologia, ematologia, medicina trasfusionale, microbiologia/virologia, genetica e fecondazione *in vitro*. Per la prima volta gli autori hanno fornito indicazioni sulla configurazione di un programma di formazione e sull'assegnazione delle risorse richieste dai tirocinanti, dai loro supervisori e dalle istituzioni.

## STRUTTURA DEL PROGRAMMA DI FORMAZIONE

### Gli obiettivi

Nel corso della formazione, l'obiettivo sarà quello di sviluppare conoscenze, abilità, competenze, attitudini e comportamenti coerenti con la pratica clinica, scientifica e professionale di livello specialistico.

Da un punto di vista clinico, lo specialista sceglie le indagini cliniche appropriate per la propria popolazione, valuta in che modo tali indagini si rapportano alla diagnosi, alla gestione del paziente e alla prognosi e fornisce le competenze per garantirne un'applicazione appropriata. Dal punto di vista scientifico, deve essere in grado di valutare l'ambito dei servizi necessari, di pianificarne e implementarne l'erogazione, e di garantire un ambiente di lavoro sicuro ed efficace. Professionalmente, lo specialista deve essere in grado di assumersi le responsabilità delle proprie azioni, e, lavorando in autonomia, di prendere decisioni in situazioni complesse e imprevedibili. Inoltre, gli specialisti scelgono, pianificano, conducono, riportano, diffondono e adottano i risultati delle loro ricerche, scoperte e innovazioni. Il loro ruolo dirigenziale deve contribuire al progresso della salute e dei servizi sanitari.

### Gli ambienti per la formazione

La formazione dovrà realizzarsi in un ambiente di lavoro controllato, situato in centri di qualità e accreditati, in grado di incoraggiare un apprendimento indipendente e basato sull'esperienza.

La formazione dovrà essere acquisita in un ambiente multidisciplinare con i colleghi di tutte le professioni mediche/scientifiche/farmaceutiche, infermieristiche, paramediche e professioni sanitarie non cliniche. Il tirocinante dovrà essere sostenuto nella partecipazione a riunioni e a corsi locali, nazionali e, se pertinenti, internazionali. L'esperienza di lavoro in più di un centro è importante al fine di consentire l'esposizione ad una varietà di ambienti clinici e scientifici.

### Il ruolo del supervisore alla formazione

L'obiettivo del supervisore è sostenere e guidare il tirocinante, promuovere opportunità di apprendimento indipendente e di attività ponderate e incoraggiare il raggiungimento di obiettivi e standard di lavoro di elevata qualità. Il supervisore dovrà essere un professionista di comprovata esperienza, che possieda familiarità con i requisiti di istruzione/formazione specialistici, con

esperienza dimostrata nell'insegnamento e nella formazione e dovrà avere tempo sufficiente da dedicare alla formazione. Il supervisore, inoltre, ha la responsabilità di concordare un piano di formazione, di monitorare e verificare i progressi, assicurando con regolarità una valutazione interna ed esterna delle competenze acquisite.

### Il ruolo del tirocinante

Sebbene alcuni insegnamenti possano essere guidati/orientati, cogliere le opportunità di apprendimento autonomo e acquisire esperienze basate sul lavoro personale, contribuirà ad orientare l'approccio del tirocinante a un futuro lavoro indipendente. Gli esempi includono:

- partecipazione a incontri di gruppo multidisciplinari, e turni in reparti di cura che svolgano assistenza primaria e secondaria;
- partecipazione a forum di gruppo, di gestione e di direzione;
- collegamento con l'industria diagnostica nella fornitura, implementazione e formazione nell'uso di nuove tecnologie;
- comunicazione e collaborazione a fianco di operatori sanitari clinici e non clinici con un assetto lavorativo di 24 ore su 24, 7 giorni su 7;
- partecipazione alla scelta delle analisi da richiedere e all'interpretazione dei risultati;
- svolgere attività didattica;
- diffondere progetti di ricerca, di sviluppo e di innovazione attraverso pubblicazioni e relazioni.

Un diario delle attività formative, basato sul Syllabus e su cui annotare le conoscenze, le abilità e le competenze che verranno acquisite durante il periodo di formazione, può fornire un valido spunto di riflessione sulle esperienze fatte, sui punti di forza, e su quelli di debolezza e sui bisogni di apprendimento. Il diario delle attività formative proposto può essere scaricato dal sito web EFLM ed è disponibile, come materiale supplementare, di questo articolo nella versione in Inglese e Italiano ([2S](#) e [3S](#)).

### Valutazione delle competenze

Il supervisore dovrà mettere in atto un programma che:

- fornisca evidenze di una soddisfacente acquisizione delle conoscenze, delle abilità e delle competenze adeguate ad uno specialista;
- fornisca evidenze della capacità, della professionalità e delle potenzialità del tirocinante;
- consenta al tirocinante di dimostrare la predisposizione a progredire;
- generi informazioni relative alla progressione e alle esigenze di apprendimento;
- aiuti a individuare un tirocinante che potrebbe essere in difficoltà e che potrebbe aver bisogno di un supporto ulteriore.

### Metodo di valutazione:

Gli strumenti che possono essere utilizzati per valutazioni accademiche, professionali e lavorative comprendono:

- esame formale interno/esterno: questo potrebbe prevedere saggi, domande a risposta breve e/o a risposta multipla, esercitazioni di laboratorio, esame orale, valutazioni di scenari critici, dissertazioni scritte;
- osservazione diretta: acquisire una valutazione del supervisore e di altri soggetti/colleghi, sia interni che esterni, delle nozioni specialistiche che il tirocinante sta acquisendo, delle competenze apprese e della sua maturazione personale e professionale;
- valutazioni indirette: acquisire l'opinione di soggetti esterni in merito alle conoscenze, alle abilità, alle competenze, alle attitudini, ai comportamenti, alle esigenze di apprendimento e al potenziale del tirocinante;
- discussione di casi: acquisire il punto di vista del tirocinante su una serie di argomenti – clinici, scientifici, professionali – e ottenere un resoconto basato sui punti di forza e di debolezza, sulle qualità personali e sulle sue capacità di comprendere i ruoli e i contributi;
- utilizzo di diari dell'attività formativa che registrino le aspettative del programma educativo rispetto ai traguardi raggiunti e agli obiettivi di avanzamento e che possano incoraggiare i supervisori a fornire contributi;
- valutazione della produzione di elaborati scritti: gli esempi includono pubblicazioni ("peer reviewed"), verifiche e documenti su linee di condotta e di procedure;
- valutazione interna ed esterna.

## LA REALIZZAZIONE DI UN PERCORSO COMUNE DI FORMAZIONE

Sebbene il Syllabus rappresenti un importante traguardo, un elemento chiave in un CTF è un modello che consenta ai governi nazionali di riconoscere le qualifiche di ciascun specialista. Dal 2002, le conoscenze e le competenze necessarie per acquisire la qualifica a livello specialistico sono state identificate attraverso un registro professionale (5-6); i soggetti che richiedono la registrazione, sono tenuti a rispettare l'Equivalenza aggiornata degli Standard, tra i professionisti di formazione medica, scientifica e farmaceutica della Comunità Europea.

### Il percorso comune di formazione:

- definisce un Laurea Specialistica ("Master of Science" o equivalente) come qualifica sufficiente successiva ad un periodo di formazione accademica iniziale di 5 anni, seguito da un titolo professionale, conseguito dopo una formazione professionale di almeno 4 anni<sup>1</sup>;
- include le aspettative per l'istruzione e per la

<sup>1</sup> Idealmente 5 anni: nel nostro Paese evidentemente ci si riferisce alle Scuole di Specializzazione, NdR.

formazione adeguate a seguire questo Syllabus ed identifica, inoltre, le competenze richieste per assicurare ai pazienti di ricevere cure sicure e di alta qualità;

- richiede che gli specialisti siano inclusi in un registro professionale (se disponibile) nel loro paese d'origine e che mantengano le loro competenze e conoscenze di base partecipando alle attività di aggiornamento professionale continuo<sup>2</sup>.

In base alle esigenze dei paesi regolamentati, il percorso dovrebbe avere un contenuto formativo che includa:

- almeno il 35% di chimica generale;
- almeno il 65% di chimica generale e ematologia;
- flessibilità per il rimanente 35%, che comprenda chimica generale, ematologia, microbiologia, genetica e fecondazione *in vitro* (FIV) con una proporzione in linea con i requisiti del paese di destinazione e composto da esperienze lavorative, corsi accreditati, esami pertinenti ai programmi di formazione nazionale, tirocini.

## APPROCCIO AL SYLLABUS

Il programma è suddiviso in 4 sezioni principali:

- sezione A: presenta le conoscenze, le abilità e le competenze generiche che devono essere acquisite durante la formazione;
- sezione B: presenta le conoscenze specialistiche da acquisire all'interno di ciascuna disciplina;
- sezione C: presenta le capacità e le competenze richieste per svolgere attività di ricerca, sviluppo e revisione;
- sezione D: presenta le capacità e le competenze in ambito dirigenziale.

Entro la fine del percorso formativo, lo specialista dovrà essere in grado di intraprendere un aggiornamento professionale continuo, assumendosi responsabilità personali lavorando autonomamente in situazioni complesse e imprevedibili.

## A. MEDICINA DI LABORATORIO: CONOSCENZE, CAPACITÀ E COMPETENZE GENERALI

### A1: Requisiti di conoscenza di base

1. Conoscenza della struttura e della funzione delle cellule procariotiche ed eucariotiche e dei virus;
2. comprensione del livello chimico, cellulare e tissutale dell'organizzazione del corpo umano;
3. comprensione della normale anatomia, fisiologia e patologia del corpo: sistema tegumentario, scheletrico, nervoso, cardiovascolare (incluso il sangue, i vasi sanguigni e il sistema linfatico), respiratorio, endocrino, renale, gastro-intestinale (inclusa la nutrizione), il sistema urinario e il sistema riproduttivo;

4. conoscenza del processo attraverso il quale avviene lo sviluppo embrionale dal concepimento alla nascita;
5. conoscenza dei principi dell'ereditarietà, DNA e genetica incluso lo stato di portatore, incroci genetici/pedigree/quadrati di Punnett/schemi incrociati;
6. conoscenza delle risposte cellulari, tissutali e di sistema alle malattie, tra cui morte cellulare, infiammazione, neoplasie, ipertrofia, iperplasia e risposta tissutale a lesioni e riparazioni;
7. descrizione della fisiopatologia dello sviluppo della malattia nelle malattie comuni che interessano i diversi sistemi dell'organismo;
8. comprensione dei principi di base dell'istologia incluse la microscopia e le tecniche di colorazione;
9. comprensione dei principi di base della farmacologia e della tossicologia inclusi la farmacocinetica, la farmacodinamica, la farmacogenomica, la tossicocinetica, la tossicodinamica, la tossicogenomica e nutrigenomica;
10. comprensione dei principi di base dell'epidemiologia;
11. comprensione della personalizzazione della medicina di laboratorio basata sulle tecnologie avanzate cosiddette "omiche" (metabolomica, proteomica, trascrittomica, genomica).

### Competenze

- Ampia conoscenza di tutti gli aspetti delle scienze del laboratorio clinico rilevanti per la disciplina esercitata;
- ampia conoscenza e approfondimento dei processi biochimici, ematologici e immunologici nella salute e nella malattia dell'uomo a livello generale e paziente-specifico;
- apprezzamento degli sviluppi scientifici e tecnologici nella comprensione delle malattie al fine di garantire l'uso appropriato delle indagini di laboratorio.

## A2: Indicazioni per le applicazioni della Medicina di Laboratorio

Obiettivi formativi: comprensione dell'ambito di applicazioni pratiche della medicina di laboratorio.

1. Nella diagnosi precoce di malattia o della suscettibilità alla malattia, nello screening e nell'epidemiologia;
2. nella diagnosi di malattie organo-correlate;
3. nel monitoraggio delle funzioni vitali e nella previsione del decorso della malattia;
4. nel trattamento mirato, prevedendo e monitorando la risposta alla terapia;
5. indicazioni per esami specialistici successivi;
6. indicazioni per test funzionali;
7. nella valutazione prognostica.

### Competenze

- Apprezzamento degli sviluppi scientifici e tecnologici della comprensione della malattia al fine di garantire l'uso appropriato delle indagini di laboratorio.

<sup>2</sup>Continuous Professional Development in lingua Inglese, ECM in Italia, NdR.

### A3: Importanza della raccolta e conservazione dei campioni

Obiettivi formativi: comprensione dei fattori pre-analitici che potrebbero influenzare l'affidabilità dei risultati delle analisi.

1. Luogo e ora della raccolta del campione, conservazione, influenza dell'alimentazione, dei farmaci, della postura, dello stato di digiuno;
2. scelta e uso corretto degli anticoagulanti e dei mezzi di trasporto, sequenza di riempimento delle provette, effetti del laccio emostatico;
3. attenzione nella gestione dei campioni, nell'identificazione del paziente, nel trasporto, nella conservazione, nella stabilità degli analiti, nell'influenza della temperatura, nel congelamento/scongelamento.

#### Competenze

- Riconoscimento dei fattori pre-analitici che influenzano la validità del processo analitico;
- capacità di descrivere i requisiti pre-analitici di un servizio di medicina di laboratorio.

### A4: Principi e tecniche analitiche

Obiettivi formativi: entro la fine del percorso formativo, lo specialista dovrà conoscere i principi delle tecniche analitiche, i loro limiti e le loro applicazioni.

#### A4.1 Principi e tecniche analitiche

1. Tecniche separative:
  - a. cromatografia: liquida, gascromatografia, su strato sottile, su colonna ad alta prestazione, di affinità;
  - b. elettroforesi: su gel, capillare zonale, focalizzazione isoelettrica;
  - c. dialisi all'equilibrio;
  - d. centrifugazione e ultra centrifugazione;
  - e. estrazione liquido-liquido e in fase solida.
2. Tecniche analitiche standard:
  - a. titolazione (titrimetria);
  - b. osmometria.
3. Metodi spettrometrici:
  - a. spettrofotometria: in ultravioletto e nel visibile;
  - b. assorbimento atomico;
  - c. turbidimetria;
  - d. nefelometria;
  - e. fluorimetria;
  - f. spettrometria di emissione di fiamma;
  - g. riflettometria;
  - h. spettrometria di massa, spettrometria di massa tandem;
  - i. spettrometria di massa "Matrix Assisted Laser Desorption Ionization" - "Time of Fly" (MALDI-TOF);
  - j. risonanza magnetica nucleare;
  - k. infrarossi.
4. Tecniche elettrochimiche:
  - a. elettrodi ione-selettivi;
  - b. biosensori impedenziometrici (per il conteggio cellulare);

5. Tecniche di biologia molecolare:
  - a. estrazione, preparazione e tecniche di separazione del DNA/RNA;
  - b. reazione a catena della polimerasi (PCR), trascrizione inversa (RT-PCR);
  - c. tecniche di PCR quantitative ("real time PCR", "digital PCR");
  - d. tecniche per la rilevazione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs);
  - e. tecniche per individuare variazioni genetiche più complesse, metodologie di sequenziamento del DNA;
  - f. microsatelliti e tecnologie array;
  - g. analisi citogenetiche;
  - h. ibridazione fluorescente *in situ* (FISH);
  - i. ibridazione genomica comparativa.
6. Tecniche immunologiche:
  - a. principi della reazione antigene-anticorpo, formulazione del dosaggio immunologico;
  - b. immunodosaggio competitivo;
  - c. immunodosaggio non competitivo;
  - d. analisi in fase omogenea e in fase eterogenea;
  - e. interferenze nei metodi immunologici;
  - f. sistemi di rilevamento del segnale: radioisotopi, marcatori colorimetrici / fluorimetrici;
  - g. immunoprecipitazione (immunofissazione, immunoturbidimetria, immunonefelometria);
  - h. tecniche di agglutinazione.
7. Enzimi:
  - a. tecniche analitiche: velocità di reazione, analisi a punto finale;
  - b. enzimi come reagenti;
  - c. cinetica enzimatica, inibitori, comportamento allosterico.
8. Microscopia:
  - a. microscopia in campo chiaro, a contrasto di fase, polarizzante, a contrasto interferenziale, in campo scuro, a fluorescenza;
9. Citometria a flusso:
  - a. conta cellulare, rilevamento di marcatori cellulari e fluorocromi;
  - b. sottosistemi: sistema fluidico, ottico ed elettronico.
10. Tecniche di colorazione delle cellule ematologiche e preparazione di strisci, vetrini o film;
11. Test crociati per le trasfusioni di sangue. Test antiglobulina indiretto e diretto; sistemi Rhesus e ABO;
12. Emoreologia;
13. Coltura e sensibilità agli antibiotici; coltura microbica, scelta dei terreni, condizioni di incubazione, tecniche di identificazione dei microorganismi, test di sensibilità agli antibiotici;
14. Tecniche di colorazione delle cellule microbiche-identificazione di microbi, virus, parassiti e funghi (comprese le principali caratteristiche differenziali);
15. Diagnostica sierologica per le malattie infettive.

#### Competenze

- Conoscenza e comprensione dell'uso e dei limiti della tecnologia e delle tecniche analitiche rilevanti

- nell'ambito della specializzazione;
- riconoscimento degli sviluppi tecnologici con approcci innovativi e creativi alla loro attuazione;
- conoscenza specialistica all'interno delle specialità scelte.

### A5: Metodologia di riferimento

Obiettivi formativi: comprensione dei principi della riferibilità metrologica per la standardizzazione delle misure.

1. Livelli metrologici di riferibilità dipendenti dalla disponibilità di procedure di misurazione definitive e di riferimento;
2. livelli metrologici di riferibilità dipendenti dalla disponibilità di materiali di riferimento certificati;
3. regolamento del Parlamento e del Consiglio Europeo relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro* (che abroga la direttiva 98/79 / CE) come base giuridica per la riferibilità metrologica e la standardizzazione delle misure in Medicina di Laboratorio;
4. concetto internazionale di riferibilità metrologica delle misure in Medicina di Laboratorio in accordo alla disponibilità di standard internazionali.

#### Competenze

- Capacità di differenziare i criteri del rendimento delle prestazioni, delle misure definitive e di riferimento effettuate nella diagnostica di laboratorio di routine;
- capacità di riconoscere i vantaggi delle misure standardizzate per lo sviluppo di intervalli di riferimento e limiti decisionali definitivi.

### A6: Valutazione e accertamento

Obiettivi formativi: acquisire le capacità e le competenze per valutare metodi, nuovi esami diagnostici e la loro applicazione.

#### A6.1 Valutazione analitica dei metodi di laboratorio

1. Norme obbligatorie a livello dell'UE e/o a livello nazionale (Regolamento del Parlamento e del Consiglio Europeo relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*);
2. assicurazione di qualità: controllo interno di qualità e verifica esterna della qualità;
3. prestazioni del metodo: precisione, accuratezza, specificità e interferenze, statistica applicata al laboratorio (ad esempio intervalli e limiti), e "carry over".

#### A6.2 Valutazione clinica dei metodi di laboratorio

1. Variabilità biologica. Influenze genetiche, ambientali, etnicità, età, sesso, alimentazione, stagione e ora del giorno, influenza degli agenti terapeutici;
2. statistica di laboratorio (ad esempio verifica della validità diagnostica) dei metodi analitici;
3. strategie diagnostiche e traguardi analitici nell'uso degli esami di chimica clinica.

#### A6.3 Metodi statistici per il laboratorio

1. Statistica di base:
  - a. statistica descrittiva (media, mediana, quantili, DS, CV, misure di correlazione);
  - b. statistica inferenziale (distribuzioni, stima dei parametri, intervalli di confidenza);
  - c. disegno sperimentale (analisi della potenza, stratificazione, effetto "batch");
  - d. elementi di base di apprendimento automatico o "machine learning".
2. Biostatistica
  - 2.1 Verifica di ipotesi:
    - a. confronto tra due gruppi (test t, test di Wilcoxon, test F);
    - b. test di correlazione (Pearson, Spearman, Fisher, Chi quadrato);
    - c. test di bontà di adattamento (Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk);
    - d. confronto tra più gruppi (ANOVA, Kruskal-Wallis, Bonferroni).
  - 2.2 Comparazione tra metodi e tecniche di visualizzazione:
    - a. regressione lineare robusta (Deming, Passing-Bablok);
    - b. metodi di visualizzazione (grafico di Youden e grafico di Bland-Altman).
  - 2.3 Intervalli e limiti:
    - a. intervalli di misura (limiti di rilevabilità/quantificazione e linearità, differenza critica);
    - b. intervalli di riferimento (metodi diretti e indiretti) e standardizzazione dei dati di laboratorio;
    - c. altri limiti e valori di soglia/decisionali (intervalli terapeutici, intervalli di rischio).
  - 2.4 Prestazioni di un test diagnostico:
    - a. sensibilità e specificità diagnostica, valori predittivi;
    - b. analisi delle curve ROC (con estensione alla classificazione multi-classe);
    - c. odds ratio.
  - 2.5 Strategie diagnostiche:
    - a. analisi esplorativa dei dati (box plot, analisi delle componenti principali -PCA-, clustering o analisi dei gruppi);
    - b. classificazione (regressione logistica, alberi decisionali).
3. Bioinformatica:
  - a. tecnologie "omiche" (genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica);
  - b. banche dati (ENSEMBL, RefSeq, ClinVar, dbSNP, PDB, MASCOT, MetaboAnalyst);
  - c. formati di dati e algoritmi di ricerca (FASTA, BLAST);
  - d. analisi di sequenza ("variant calling" o chiamata delle varianti, "scoring matrices" o matrici di punteggio).

#### Competenze

- Capacità di determinare i parametri essenziali necessari per la valutazione di un metodo di

- laboratorio;
- capacità di eseguire una valutazione utilizzando appropriati strumenti statistici, fogli elettronici e database;
- capacità di comprendere il significato clinico dei risultati della valutazione di un metodo di laboratorio;
- capacità di ottenere, analizzare e utilizzare le conoscenze derivate dall'applicazione degli esami di medicina di laboratorio;
- capacità di assumersi la responsabilità dei dati e delle informazioni prodotte, compresa la conoscenza dell'effetto della variabilità (biologica e analitica) sull'interpretazione dei dati;
- capacità di comprendere i principi e i risultati dell'analisi multivariata;
- comprensione di base degli strumenti e degli algoritmi bioinformatici maggiormente diffusi.

#### **A7: Valutazione clinica degli esami di laboratorio caso-specifici**

Obiettivi formativi: Basare la scelta degli esami e l'interpretazione dei risultati sulle prove di evidenza disponibili.

1. Valutazione dei risultati individuali (identificazione dei valori estremi, riconoscimento del significato dei risultati precedenti, identificazione di quadri analitici tipici di malattia);
2. utilizzo dei valori di riferimento (tenendo conto delle influenze dovute all'età, alla genetica, al sesso, allo stile di vita, ai fattori interferenti, all'effetto degli agenti terapeutici, alla variazione biologica e analitica) e dei valori decisionali;
3. valutazione longitudinale delle differenze critiche durante il decorso della malattia, come nelle condizioni a lungo termine, durante il monitoraggio terapeutico di un farmaco e come risultato delle modifiche del regime terapeutico;
4. strategie di richiesta raccomandate in risposta a quesiti clinici per un intervento e una consulenza;
5. decisione autonoma e/o raccomandazione di ulteriori indagini, esami riflessi;
6. referto di laboratorio: fornire valutazioni, consulenza e commenti interpretativi.

#### *Competenze*

- Disponibilità a fornire linee guida interpretative, consultive e di intervento relative all'utilizzo degli esami di laboratorio, quando appropriate;
- capacità di comunicare il valore delle indagini di laboratorio agli utenti del servizio.

#### **A8: Formazione clinica**

Obiettivi formativi: valutare il contributo della medicina di laboratorio nel migliorare lo stato di salute e nel fornire una migliore assistenza.

Entro la fine del percorso formativo, uno specialista in medicina di laboratorio dovrà essere in grado di valutare i servizi clinici di alta qualità, che sono mirati a soddisfare

le esigenze degli individui e di gruppi di pazienti. La formazione richiede l'interazione con ambienti clinici in cui la medicina di laboratorio incide sulla cura del paziente. Gli esempi includono la gestione di episodi acuti e critici e l'implementazione di "points of care testing" (POCT). Gli strumenti per acquisire una competenza clinica sono la partecipazione ai turni di reparto e la fornitura di cure cliniche dirette (se appropriate) come membri attivi del gruppo clinico così come altri contatti con gli utenti del laboratorio. La partecipazione e la gestione di seminari e il dibattito su casi clinici forniscono esperienze preziose.

#### *Competenze*

- Capacità di comunicare efficacemente con i colleghi relativamente alla pianificazione e alla fornitura di servizi clinici;
- comprensione della propria responsabilità professionale per il benessere e la sicurezza personale dei pazienti, dei colleghi, dell'ambiente della comunità a cui si appartiene e del posto di lavoro;
- capacità di fornire cure cliniche dirette, quando appropriato;
- capacità di suggerire esami di laboratorio appropriati per la diagnosi di una specifica patologia e capacità d'interpretazione dei risultati ottenuti;
- capacità di preparare relazioni cliniche interpretando i risultati delle indagini di laboratorio.

### **B. DISCIPLINE DELLA MEDICINA DI LABORATORIO: CONOSCENZE SPECIALISTICHE (4-7,10)**

#### **B1: Chimica clinica/Immunologia**

1. Determinazione delle proteine e degli amminoacidi nel siero: comprendere i principi della misurazione delle proteine nei fluidi corporei. Conoscere i criteri di base per la misura delle proteine nel siero, nelle urine, nel liquido cerebrospinale (CSF) e per l'esecuzione dell'elettroforesi delle proteine. Conoscere le proprietà e la funzione delle proteine principali, come l'albumina, gli inibitori delle proteasi, le proteine di trasporto, la ceruloplasmina, i fattori di coagulazione e le immunoglobuline. Comprendere la risposta di fase acuta e il suo effetto sulla misura di altri esami di laboratorio. Identificare i principali quadri di disproteinemia e paraproteinemia così come il deficit di alfa-antitripsina e delle immunoglobuline;
2. determinazione dei lipidi: conoscere la struttura chimica, la biosintesi, la classificazione, la funzione e il metabolismo dei lipidi e delle lipoproteine. Comprendere le basi metaboliche dell'iper- e dell'ipolipoproteinemia ereditaria e acquisita. Comprendere e valutare le basi biochimiche dell'ateroma, della malattia coronarica, dei fattori di rischio associati e della prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardiovascolari. Conoscere la classificazione di Fredrickson e il trattamento dell'ipercolesterolemia negli adulti e la classificazione

- dell'iperlipidemia. Conoscere i principi delle tecniche analitiche per le indagini di laboratorio sui lipidi;
3. funzione gastrica, pancreatica e intestinale: entro la fine del periodo di formazione il tirocinante dovrà conoscere la fisiologia e la biochimica della digestione. La funzione endocrina dell'intestino, la produzione e il controllo degli ormoni gastrointestinali con esempi di condizioni patologiche come l'ulcera peptica e i tumori pancreatici. Conoscere le principali condizioni patologiche dell'intestino, ad esempio l'ostruzione pilorica, il malassorbimento, la pancreatite, l'anemia dovuta a malattie intestinali, l'insufficienza intestinale, i tumori maligni inclusi la sindrome carcinoide e i tumori neuroendocrini. Conoscere le indagini relative alla funzione intestinale, agli ormoni intestinali, al malassorbimento e alla diarrea. I principi e i problemi pratici dell'analisi fecale;
  4. glucosio e diabete mellito: comprendere il metabolismo del glucosio e dei carboidrati (insulina, peptide C e altri ormoni regolatori). Conoscere la classificazione del diabete, i criteri diagnostici per il diabete, le condizioni di ridotta tolleranza al glucosio ed alterata glicemia a digiuno. Conoscere l'importanza dell'emoglobina glicata e il suo ruolo nella diagnosi e nella sorveglianza del diabete. Comprendere la fisiopatologia del diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2, del diabete secondario e del diabete gestazionale. Conoscere le complicanze acute del diabete, come la chetoacidosi diabetica e lo stato iperglicemico iperosmolare, nonché le complicanze croniche come le malattie microvascolari e macrovascolari. Comprendere i principi del trattamento del diabete e del suo monitoraggio, compreso il monitoraggio della glicemia, l'uso di insulina, il controllo dietetico e di altri agenti farmacologici. Approfondire le conoscenze delle indagini di laboratorio sul diabete, tra cui la glicemia, il test da carico orale di glucosio, la determinazione della emoglobina glicata (HbA1c) e della albumina urinaria. Familiarizzare con la sindrome metabolica e conoscere la diagnosi e le indagini da eseguire nell'ipoglicemia;
  5. metabolismo osseo e minerale: comprendere la biochimica e la fisiologia del metabolismo osseo incluso il calcio, il fosfato, il magnesio, l'ormone paratiroideo e la vitamina D. Conoscere le cause, le indagini, la diagnosi e il monitoraggio di condizioni quali l'iper- e ipoparatiroidismo, l'iper- e ipocalcemia, l'iper- e ipofosfatemia, l'iper- e ipomagnesiemia. Avere familiarità con condizioni come l'osteoporosi (compresi gli effetti della terapia steroidea), l'osteomalacia, l'osteodistrofia renale, la malattia di Paget e il malassorbimento cronico. Conoscere gli ormoni che regolano il metabolismo minerale (ormone paratiroideo -PTH-, calcitonina e vitamina D) e la proteina correlata al paratormone (PTHrP). Conoscere le metodologie per la determinazione del PTH, del calcio (totale, ionizzato e aggiustato) e della vitamina D;
  6. porfirine: comprendere la biochimica e la fisiologia del metabolismo dell'emoglobina. La base metabolica, la diagnosi, l'indagine e il monitoraggio delle porfirie;
  7. neoplasie (marcatori tumorali): conoscere l'insieme dei marcatori tumorali misurati nei laboratori clinici e la loro relazione con specifici tipi di cancro tra cui il tumore alla prostata, al polmone, alla mammella, all'ovaio, alla tiroide, all'ipofisi, al surrene, al fegato, alla pelle, i tumori del testicolo e quelli del tratto gastro-intestinale. Conoscere i principi e i limiti dei metodi di laboratorio per la misura dei marcatori tumorali, il processo patologico che porta alla produzione dei marcatori tumorali e i criteri per l'individuazione di un marcatore tumorale ideale. Comprendere il valore dei marcatori tumorali nella diagnosi, nello screening, nella prognosi e nel monitoraggio.  
Biopsia liquida: avere familiarità con l'eterogeneità clonale e con le principali aberrazioni genetiche nel cancro umano. Conoscere le più importanti metodiche molecolari per il rilevamento ad elevata sensibilità dei geni tumorali mutati nel plasma;
  8. marcatori cardiaci e valutazione del sistema cardiovascolare: conoscere la definizione di infarto del miocardio e comprendere l'importanza/l'influenza delle modalità diagnostiche con la sua definizione. Capire gli attuali metodi per il calcolo del rischio, i loro limiti e l'uso di marcatori biochimici per la stratificazione del rischio nelle sindromi coronariche acute. Conoscere la fisiopatologia e la valutazione dell'insufficienza cardiaca congestizia. Conoscere i marcatori di insufficienza cardiaca congestizia e le loro limitazioni biologiche e tecniche. Comprendere l'utilità dei marcatori di infiammazione nella valutazione del rischio cardiaco (ad esempio omocisteina e proteina C-reattiva ad alta sensibilità). Conoscere le indagini biochimiche per la gestione dell'ipertensione.
  9. Endocrinologia
    - 9.1 ghiandola tiroide: comprendere la struttura, la biosintesi, la secrezione e il metabolismo degli ormoni tiroidei. Conoscere la fisiologia della tiroide e le cause più comuni delle patologie tiroidee, tra cui l'ipotiroidismo congenito e il relativo programma di screening, l'ipo- e ipertiroidismo, la malattia autoimmune, gli autoanticorpi, le neoplasie associate tra cui l'adenoma e il carcinoma e il carcinoma midollare della tiroide. Conoscere gli esami di laboratorio per indagare i disordini tiroidei ed essere in grado di interpretare questi analiti nel loro contesto clinico con la valutazione dello stato di malattia eutiroidea. Avere familiarità con le attuali metodologie analitiche delle indagini per la tiroide e i relativi limiti;
    - 9.2 ghiandola pituitaria: comprendere i meccanismi di regolazione in endocrinologia e come questi vengono utilizzati nei test diagnostici. Comprendere l'azione fisiologica, la biochimica e la regolazione degli ormoni pituitari dell'ipofisi anteriore e posteriore. Comprendere i principi dei differenti esami di funzionalità dinamica endocrina. Comprendere la fisiopatologia dei disturbi dell'ipofisi quali l'acromegalia, il nanismo, il

- prolattinoma, il diabete insipido, il panipopituitarismo e i deficit ormonali isolati. Comprendere gli effetti endocrini del cancro, compresi gli ormoni ectopici, la neoplasia endocrina multipla e i tumori neuroendocrini.
- 9.3 ghiandola surrenale: comprendere la fisiologia della funzione della corteccia surrenale e delle sue disfunzioni, inclusa la produzione in eccesso e le carenze di steroidi. Comprendere la biochimica, la biosintesi, la struttura chimica e il metabolismo dei glucocorticoidi e dei mineralcorticoidi. Sapere come valutare la riserva surrenale e come indagare la sindrome di Cushing, la malattia di Conn e l'iperplasia surrenale congenita. Comprendere la fisiopatologia della midollare surrenale, compreso il metabolismo delle catecolamine, e i loro metaboliti, il feocromocitoma e il neuroblastoma. Conoscere la determinazione dei marcatori biochimici per la valutazione della midollare del surrene. Comprendere i principi dei test di soppressione e di stimolazione della ghiandola surrenale. Comprendere la regolazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone. Comprendere la sintesi e il metabolismo delle ammine biogeniche, comprese le catecolamine e la serotonina, nonché i test di laboratorio per la loro valutazione.
10. Funzione riproduttiva e gravidanza: comprendere l'endocrinologia delle gonadi, compresi l'asse ipofisario-gonadico, le disfunzioni sessuali, la pubertà precoce o ritardata, il ciclo ovarico, il metabolismo del testosterone, l'insufficienza ovarica, la menopausa e la sindrome dell'ovaio policistico. Avere familiarità con la valutazione biochimica dell'irsutismo e della virilizzazione. Comprendere i principi della terapia ormonale sostitutiva e dei contraccettivi orali. Comprendere la fisiologia e la biochimica clinica della gravidanza e le indagini prenatali. Conoscere le cause, le indagini, il monitoraggio e la gestione delle complicanze della gravidanza come la mola idatiforme e il coriocarcinoma.
11. Biochimica pediatrica ed errori congeniti del metabolismo: comprendere la fisiologia e la biochimica dello sviluppo neonatale. Il bilancio idrico del neonato e i disturbi biochimici associati ad una eccessiva idratazione o a disidratazione. Conoscere le cause, le indagini appropriate, il monitoraggio e la gestione di condizioni come l'ittero, l'ipoglicemia, le patologie epatiche, l'ipomagnesiemia, l'iperammoniemia, i disordini dell'omeostasi del calcio e del fosforo, le malattie della prematurità come la malattia metabolica ossea. Comprendere le differenze e gli aspetti tipici della chimica clinica pediatrica e neonatale inclusi gli intervalli di riferimento. Conoscere le indagini relative al ritardo di crescita. Conoscere le cause, le indagini, la diagnosi, il monitoraggio e la gestione di condizioni quali l'ipoglicemia, i disturbi ereditari e acquisiti del calcio e fosforo, l'iperammoniemia, l'acidosi lattica e le malattie renali inclusa la sindrome di Fanconi e le tubulopatie.
12. Conoscere i principi chiave e i criteri per stabilire programmi di screening efficaci. Comprendere il ruolo dello screening prenatale per disturbi come le anomalie fetali (biomarcatori sierici e programmi di analisi del DNA fetale); programmi neonatali relativi alla fenilchetonuria e l'ipotiroidismo congenito; programmi di screening per il cancro come quelli per la prostata (gestione del rischio), per il cancro al seno e al colon-retto.
13. Disturbi metabolici ereditari: comprendere la fisiopatologia e la biochimica, la presentazione clinica e la gestione delle malattie metaboliche ereditarie. Comprendere i principi dei blocchi enzimatici nelle vie metaboliche e i conseguenti segni clinici e patologici nelle comuni malattie metaboliche ereditarie. Conoscere i metodi di indagine, di diagnosi e di monitoraggio della fibrosi cistica, dei disturbi del metabolismo degli aminoacidi, della malattia da accumulo di glicogeno, del metabolismo dei carboidrati, della lipidosi cerebrale, dei difetti di ossidazione degli acidi grassi, del disordine del metabolismo dei metalli, dei disordini mitocondriali, della mucopolisaccaridosi, dei disordini degli acidi organici, delle malattie perossisomiali, dei disordini primari e secondari della purina e della pirimidina, dei difetti di trasporto e disturbi del ciclo dell'urea. Conoscere l'indagine prenatale delle malattie metaboliche ereditarie del feto. Comprendere le cause, le indagini e il monitoraggio dell'encefalopatia e dell'iperammoniemia. Conoscere le analisi degli aminoacidi, degli acidi organici, della carnitina, della acil-carnitina, i saggi enzimatici, le indagini inerenti la mucopolisaccaridosi, le colture tissutali e le indagini sul DNA.
14. Tratto urogenitale: al termine del percorso formativo il tirocinante dovrà conoscere la composizione dell'urina, il meccanismo di formazione dei calcoli, la funzione tubulare renale, i difetti e le caratteristiche del difetto tubulare renale. Essere in grado di effettuare la diagnosi e la valutazione della patologia prostatica e renale, del cancro alla vescica e alla prostata.
15. Fegato e tratto biliare: comprendere le funzioni del fegato, il meccanismo degli enzimi epatici e l'utilità clinica della misurazione degli enzimi epatici. Comprendere il metabolismo e la formazione della bilirubina, la circolazione enteroepatica, i sali biliari e le cause dell'ittero. Comprendere gli aspetti tipici della bilirubina neonatale e i difetti genetici che influiscono sul metabolismo della bilirubina. Conoscere le malattie epatiche come l'epatite virale, l'epatite autoimmune, la cirrosi epatica, epatotossicità da alcol/droga, la steatosi epatica non alcolica, la colestasi, l'ostruzione biliare e le malattie ereditarie come l'emocromatosi e il morbo di Wilson. Conoscere clinicamente e biochimicamente l'insufficienza epatica e l'encefalopatia; saper valutare la funzionalità epatica.
16. Valutazione della funzionalità renale: il tirocinante, al termine del percorso formativo, dovrà conoscere la fisiologia renale e le modalità per la sua valutazione.

- Tale valutazione include: la funzione glomerulare e tubulare; l'omeostasi idrico-salina e degli ioni idrogeno, la produzione renale di ormoni, quali renina, eritropoietina e vitamina D. Comprendere la fisiologia della funzione renale e distinguere tra malattia pre-renale, intrinseca e post-renale, insufficienza renale acuta o cronica e la sindrome uremica. Conoscere i metodi analitici per la misurazione della creatinina, dell'azoto ureico e della proteinuria. Comprendere come valutare la funzionalità renale, compresa la misurazione e la stima della velocità di filtrazione glomerulare, i marcatori di funzione renale, i test di funzionalità tubulare calcolando il rapporto proteina/creatinina e l'interferenza dei farmaci nell'analisi delle urine.
17. Acqua ed elettroliti: comprendere la distribuzione di acqua ed elettroliti, la gestione renale degli elettroliti e di altri metaboliti chiave e l'interpretazione delle misure degli elettroliti urinari. Comprendere la definizione di osmolalità e il calcolo del gap osmotico. Comprendere le insidie e le fonti di errore più comuni durante la stima del gap osmotico (ad esempio iperproteinemia, iperlipidemia, ipermagnesemia). Comprendere la diagnosi differenziale di un inspiegabile aumentato gap osmotico, inclusi l'assunzione di alcol o glicole, la chetosi alcolica o diabetica (chetoacidosi) e l'osmoterapia (ad esempio, la somministrazione di mannitolo o glicerolo). Comprendere i principi dell'equilibrio idrico, la regolazione del fluido extracellulare, il ruolo dell'ormone antidiuretico, del sistema renina-angiotensina-aldosterone e dei peptidi natriuretici. Comprendere le condizioni in cui possono verificarsi iper- o ipoidratazione e i principi della fluidoterapia per via endovenosa.
  18. Valutazione della funzione polmonare, dei gas ematici e della saturazione di ossigeno, dello stato acido-base e dei disturbi elettrolitici più rilevanti. Comprendere la fisiologia della respirazione normale, dell'O<sub>2</sub>, della CO<sub>2</sub>, del trasporto e dei tamponi. Comprendere i principi del gradiente di O<sub>2</sub> alveolare-arterioso e il gap anionico. Comprendere le cause e la valutazione dei disturbi acido-base e comprendere i principi delle misurazioni di H<sup>+</sup>, pCO<sub>2</sub> e pO<sub>2</sub>. Conoscere la fisiopatologia della chetoacidosi e dell'acidosi lattica. Essere in grado di descrivere la curva di dissociazione dell'emoglobina-ossigeno e i fattori che influenzano la curva. Comprendere i principi dei sistemi integrati dei gas ematici, degli elettroliti e dell'CO-ossimetria.
  19. Enzimi: comprendere il meccanismo di induzione degli enzimi, la stabilità degli enzimi e le differenze tra cinetica di primo ordine e ordine zero del metabolismo e della clearance del farmaco. Comprendere le basi strutturali e le quantificazioni degli isoenzimi. Conoscere i saggi enzimatici per amilasi, lipasi, fosfatasi alcalina, amminotransferasi, gamma-glutamyl transferasi, enzimi di conversione dell'angiotensina, creatinina chinasi e lattato deidrogenasi, colinesterasi e loro varianti.
  20. Elementi in tracce: comprendere la biochimica, la fisiologia e il metabolismo degli oligoelementi (ferro, magnesio, zinco, rame, selenio, cobalto e fluoruro). Conoscere la biochimica e il significato clinico delle proteine leganti i metalli. Conoscere le valutazioni cliniche degli elementi in traccia quali ferro sierico, la capacità legante, della transferrina, la saturazione della transferrina, la ferritina sierica, lo zinco, la protoporfirina e la ceruloplasmina nel siero.
  21. Monitoraggio terapeutico dei farmaci ("Therapeutic Drug Monitoring", TDM), droghe d'abuso e tossicologia. Comprendere i principi della farmacocinetica: l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'escrezione. Comprendere le differenze tra farmacocinetica e tossicocinetica. Essere in grado di spiegare, nel contesto del TDM, l'impatto che possono avere le malattie del tratto gastrointestinale, del fegato, del rene sul metabolismo del farmaco. Comprendere le differenze tra cinetica di primo ordine e ordine zero del metabolismo del farmaco. Comprendere i principi della farmacogenomica nell'interpretazione dei livelli di farmaco. Essere in grado di calcolare i livelli di farmaco allo stato stazionario e le concentrazioni di picco o di livello minimo attraverso un ciclo di dosaggio. Comprendere i principi della tossicodinamica delle principali droghe e veleni. Comprendere le basi fisiopatologiche ed essere in grado di riconoscere le cinque principali sindromi tossicologiche (colinergica, anticolinergica, simpaticomimetica, oppiacea e sedativo-ipnotica). Conoscere le analisi di laboratorio e la gestione dei pazienti in overdose o avvelenati. Comprendere le importanti differenze nelle informazioni ottenute dalle urine e dal sangue per il monitoraggio e il rilevamento delle droghe d'abuso. Comprendere i limiti dei protocolli di screening per le droghe. Comprendere l'effetto metabolico e i profili tossicologici di agenti specifici. Avere familiarità con le principali droghe d'abuso e le loro manifestazioni cliniche. Conoscere i metodi più comuni per la contraffazione delle urine e le tecniche disponibili in laboratorio per rilevarli. Comprendere le misure generali utilizzate nel trattamento della tossicodipendenza tra cui test di conformità per il metadone e test di conformità per sostanze d'abuso come etanolo, oppiacei, anfetamine, metilendio-metamfetamina (MDMA), benzodiazepine e cocaina. Comprendere il ruolo del laboratorio nell'indagine sul paziente incosciente in caso di sospetta intossicazione. Conoscere i vantaggi e le limitazioni delle diverse tecniche analitiche per l'analisi di sostanze sia terapeutiche che d'abuso e le cause comuni di falsi positivi dovuti alla cross-reattività. Comprendere il contesto legale per lo screening delle droghe, incluso lo screening prima di un impiego lavorativo, lo screening in ambito occupazionale/nei luoghi di lavoro e lo screening per la tossicodipendenza. Comprendere i principi e le implicazioni legali della raccolta dei campioni, della catena di custodia, del rilascio dei risultati e delle

responsabilità del datore di lavoro in relazione allo screening degli stupefacenti e alla scienza forense. Comprendere i requisiti associati allo stoccaggio e alla sicurezza dei farmaci e come indagare sui casi di tossicologia *post-mortem*.

22. Vitamine: conoscere la definizione e la classificazione delle vitamine, delle vitamine liposolubili (A, D, E e K) e delle vitamine idrosolubili (B1, B2, B6, B12 [cobalamina], C, niacina, nicotinamide, acido folico, biotina e acido pantotenico). Comprendere i disturbi clinici associati alla carenza e alla tossicità delle vitamine.
23. Sistema immunitario: comprendere il ruolo del sistema immunitario nei confronti di infezioni e delle neoplasie; comprendere le funzioni del sistema immunitario umorale e cellulare e la loro regolazione; comprendere la risposta immunitaria specifica e non specifica, comprendere il ruolo delle citochine. Comprendere l'utilizzo delle indagini per valutare il sistema immunitario; i fattori del complemento e i disordini ereditari e acquisiti. Avere familiarità con le cause primarie e secondarie del deficit di immunoglobuline, con il ruolo dei componenti cellulari e umorali nei deficit immunitari. Conoscere le immunopatie monoclonali e policlonali. Comprendere le manifestazioni cliniche, le indagini e il trattamento della malattia reumatica autoimmune sistemica e delle vasculiti sistemiche tra cui l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico, la sindrome di Sjögren, l'arterite a cellule giganti, la sindrome emolitica uremica e la glomerulonefrite. Comprendere i fattori biochimici coinvolti nello sviluppo della malattia atopica (allergia e ipersensibilità), la produzione e ruolo delle IgE, la degranolazione dei mastociti. Principi delle indagini allergologiche (inclusa la celiachia). Comprendere i principi dell'anafilassi e delle reazioni anafilattoidi.
24. Analisi dei liquidi cavitari: comprendere le indicazioni cliniche per l'analisi dei liquidi cavitari. I principi e le metodologie di analisi dei liquidi cerebrospinale, ascitico, pleurico e del fluido sinoviale. Comprendere la distinzione tra essudato e trasudato.
25. Nutrizione: comprendere la fisiologia della nutrizione umana. Conoscere le cause, le indagini, la diagnosi, il monitoraggio e la gestione della malnutrizione proteico-energetica, i marcatori dello stato nutrizionale, gli effetti della carenza o dell'eccesso di vitamine, carenza o eccesso di elementi in traccia. Avere familiarità con le condizioni nutrizionali come la sindrome da rialimentazione, la sindrome metabolica e l'obesità. Conoscere le indagini, le classificazioni, i fattori di rischio e le complicanze dell'obesità. Comprendere la biochimica della inanizione. Comprendere la gestione della dieta in malattie come la malattia infiammatoria intestinale, la celiachia, la sindrome dell'intestino corto, il cancro, la calcolosi della cistifellea, l'esofagostomia, il malassorbimento e nella fase di post chirurgia addominale maggiore.
26. Sistema neuromuscolare: conoscere la fisiologia del sistema muscolare. Comprendere la biochimica della

malattia psichiatrica e degli squilibri biochimici associati a disturbi neuromuscolari. Conoscere le cause, le indagini, il monitoraggio e la gestione dei disturbi neuromuscolari come la sclerosi multipla, la distrofia muscolare, il morbo di Parkinson e le patologie muscolari. Comprendere la fisiopatologia, la formazione e la composizione del fluido cerebrospinale e il suo ruolo nelle indagini per la diagnosi di disturbi neurologici come la meningite e la sospetta emorragia subaracnoidea.

## **B2: Ematologia e medicina trasfusionale (incluse le cellule ematiche, l'emostasi, l'immunologia cellulare e la sierologia trasfusionale)**

### *B2.1 Ematologia*

Comprendere il contesto teorico e clinico relativi a:

1. emopoiesi nello stato di salute e nella malattia;
2. morfologia e cinetica delle cellule ematiche;
3. enzimi delle cellule ematiche;
4. sintesi e degradazione dell'emoglobina, metabolismo del ferro;
5. fisiopatologia dell'emolisi e indagini correlate;
6. classificazione, indicatori clinici e marcatori di laboratorio dei disordini eritrocitari, dei granulociti e dei linfociti;
7. anomalie ematopoietiche ereditarie e acquisite, non oncologiche, comprese le emoglobinopatie e la talassemia;
8. sintomi, patogenesi e indagini di laboratorio dell'anemia (comprese le anomalie degli enzimi e della membrana eritrocitaria, il metabolismo del ferro, della vitamina B12, dell'acido folico, e di altri metaboliti);
9. sintomi, patogenesi e indagini di laboratorio di anomalie emato-oncologiche (comprese le leucemie, i disordini mieloproliferativi, i linfomi, il mieloma multiplo, la sindrome mielodisplastica);
10. metodi ematologici, immunologici, microscopici, citogenetici e molecolari utilizzati nella diagnostica dei disturbi ematologici, congiuntamente all'interpretazione dei risultati ottenuti;
11. il ruolo e la logica della diagnostica di laboratorio nella diagnosi, nella caratterizzazione, nel monitoraggio delle malattie ematologiche e nella valutazione degli effetti del trattamento;
12. acquisire le conoscenze teoriche e pratiche relative alle procedure diagnostiche in diagnostica ematologica:
  - a. esame emocromocitometrico completo: leucociti, eritrociti, emoglobina, ematocrito ed indici correlati [volume corpuscolare medio (MCV), contenuto emoglobinico medio (MCH), concentrazione emoglobinica media (MCHC), indice di distribuzione volumetrica degli eritrociti (RDW), indice di distribuzione della concentrazione emoglobinica (HDW)], piastrine (PLT), percentuali

- di grandi piastrine (P-LCR), anticorpi anti-piastrine (L-PLT), reticolociti, conta differenziale; conoscenza dei parametri ematologici;
- b. determinazione della velocità di sedimentazione degli eritrociti (VES);
- c. preparazione e colorazione degli strisci di sangue e del midollo osseo, insieme alla loro valutazione microscopica;
- d. colorazione citochimica compreso il rilevamento di mieloperossidasi (MPO), acido periodico di Schiff (PAS) Sudan nero, fosfatasi acida, esterasi, ferro;
- e. determinazione delle di emoglobine minori (HbA<sub>2</sub> e HbF) e rilevazione delle varianti emoglobiniche;
- f. rilevazione di derivati anormali dell'emoglobina (ad esempio metemoglobina): analisi spettrofotometrica;
- g. elettroforesi dell'emoglobina;
- h. rilevazione dell'emoglobina fetale (analisi di Kleihauer, determinazione citofluorimetrica della HbF);
- i. approcci diagnostico-molecolari;
- j. indagine sulle caratteristiche e le anomalie cellulari mediante citometria a flusso;
- k. citometria a flusso e ripartizione dei leucociti;
- l. immunofenotipizzazione citofluorimetrica delle neoplasie ematopoietiche.

### B2.2 Emostasi

Comprendere la teoria e i principi relativi a:

1. fisiologia dell'emostasi compreso il ruolo dei vasi sanguigni, delle piastrine, dei fattori di coagulazione, del sistema fibrinolitico e degli inibitori della coagulazione;
2. fattori di rischio emostatici per aterosclerosi e malattie cardiovascolari;
3. alterazioni ereditarie e acquisite della coagulazione che portano a emorragie e / o disturbi trombotici [comprese alterazioni piastriniche e del fibrinogeno, malattia di von Willebrand, emofilia, coagulazione intravascolare disseminata, porpora trombotica trombocitopenica (TTP), sindrome di HELLP, trombocitopenia indotta dall'eparina (HIT), trombofilia];
4. alterazioni dell'emostasi legate alle diverse malattie e alle loro fasi cliniche;
5. approccio clinico alle indagini relative all'emostasi;
6. interpretazione dei risultati di laboratorio relativi all'emostasi e ai suoi componenti;
7. marcatori di attivazione della coagulazione;
8. monitoraggio della terapia nei disturbi emorragici;
9. trattamento anticoagulante nei pazienti ricoverati e ambulatoriali;
10. terapia anticoagulante e antiaggregante;
11. acquisire le conoscenze teoriche e pratiche per le procedure diagnostiche relative all'emostasi:
  - a. tempo di protrombina (PT), tempo di tromboplastina attivata (APTT), tempo di trombina (TT), tempo di reptilasi / anrod, concentrazione e/o attività del fibrinogeno e degli altri fattori della coagulazione, test di correzione,

tromboelastogramma, plasminogeno, inibitori dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI), anticoagulanti circolanti;

- b. attivazione della trombina e della plasmina: complesso trombina-anti-trombina (TAT), frammenti di protrombina F1 + 2, D-dimero, profilo di aggregazione piastrinica (PAP);
- c. funzionalità piastrinica (retrazione del coagulo, aggregazione, PFA-100, tromboelastografia, citometria a flusso);
- d. diagnostica di laboratorio delle alterazioni del fattore di von Willebrand (vWAg, vWR: Cofattore, RIPA, multimeri, ADAMTS13);
- e. test per la trombofilia (inclusi resistenza della proteina C attivata, fattore V di Leiden, fattore II, antitrombina III, proteina C, proteina S, anticorpi antifosfolipidi,);
- f. Rapporto Internazionale Normalizzato (INR), APTT ratio, anti fattore X attivato.

### B2.3 Trasfusione di sangue

1. Principi per l'identificazione dei pazienti e test di pre-trasfusione:
  - a. antigeni del gruppo sanguigno e altri sistemi di antigeni relativi alla trasfusione di sangue (compresa la genetica);
  - b. criteri di selezione dei donatori per la trasfusione di sangue;
  - c. diversi tipi di reazioni trasfusionali, malattia emolitica materno-fetale;
  - d. applicazioni mediche, rilevanza clinica e indicazioni per la somministrazione di sangue ed emocomponenti;
  - e. preparazione e applicazione degli emocomponenti;
  - f. organizzazione delle banche del sangue;
  - g. anticorpi piastrinici;
  - h. tipizzazione di leucociti e antigeni tissutali;
  - i. riconoscimento di marcatori cellulari mediante anticorpi monoclonali. L'applicazione della plasmateresi sia in donatori che nei pazienti;
2. acquisire le conoscenze teoriche e pratiche relative alle procedure diagnostiche nella trasfusione di sangue:
  - a. tipizzazione di (auto) anticorpi irregolari; determinazione del titolo anticorpale;
  - b. tipizzazione estesa dei gruppi sanguigni;
  - c. indagini sulle reazioni trasfusionali;
  - d. tipizzazione dei linfociti B e T.

## B3: Microbiologia (batteriologia, micologia, virologia e parassitologia)

### B3.1 Batteriologia clinica

1. Strutture delle cellule batteriche e funzioni associate;
2. classificazione batterica e filogenesi;
3. fisiologia batterica (metabolismo, curva di crescita);
4. genetica batterica: ruolo degli elementi genetici mobili (plasmidi, sequenze di inserimento, integroni,

- trasposoni) nel trasferimento di geni di resistenza e virulenza e meccanismi di trasferimento (coniugazione, trasformazione, trasduzione);
5. microbiota normale: definizione, composizione, ruoli;
  6. patogenicità batterica e fattori di virulenza;
  7. biofilm microbici: definizione, infezioni associate al biofilm, resistenza agli antimicrobici;
  8. colonizzazione *versus* infezione;
  9. batteri comuni e infezioni correlate (caratteristiche morfologiche, colonie e colture, caratteristiche biochimiche, antigeniche e patogene);
  10. eziologia, fisiopatologia e manifestazioni, comprese le fonti e le vie di trasmissione, delle malattie infettive nelle comunità e infezioni acquisite in ospedale;
  11. quadri emergenti e diversificati di infezioni batteriche.

### B3.2 Virologia clinica

1. Classificazione dei virus degli animali;
2. replicazione virale e modalità di trasmissione;
3. virus comuni e infezioni umane correlate;
4. quadri emergenti e diversificati di infezioni virali;
5. sicurezza microbiologica, relativa legislazione e la sua applicazione all'interno del laboratorio.

### B3.3 Infezioni trasmesse sessualmente

1. Eziologia, fisiopatologia e manifestazioni cliniche delle più comuni infezioni sessualmente trasmesse (IST);
2. infezioni a trasmissione sessuale congenite e rischi associati;
3. indagini e gestione di problemi infettivi comuni nell'unità di terapia intensiva;
4. infezioni specifiche della gravidanza (ad esempio aborto settico, corioamnionite, endometrite);
5. infezioni che possono compromettere la gravidanza (ad esempio infezioni a trasmissione sessuale infezioni fungine, malattie parassitarie);
6. fisiopatologia delle malattie infettive nei bambini (ad esempio meningite neonatale, sepsi causate dallo *Streptococcus agalactiae* di gruppo B, infezioni dello shunt intraventricolare);
7. trattamento delle infezioni infantili, compreso l'uso selettivo di antimicrobici.

### B3.4 Micologia e parassitologia clinica

1. Replicazione fungina e modalità di trasmissione;
2. ciclo vitale dei parassiti e modalità di trasmissione;
3. patogenesi, epidemiologia, indagini cliniche e gestione delle infezioni fungine e parassitarie;
4. comuni infezioni fungine e parassitarie;
5. malattie fungine e parassitarie emergenti;
6. principi e pratica del trattamento dell'infezione da funghi e parassiti;
7. ruolo dei laboratori di microbiologia specializzati nella micologia e parassitologia.

### B3.5 Principi della terapia antimicrobica

1. Struttura, classificazione e meccanismo d'azione degli agenti antimicrobici comunemente prescritti;

2. resistenza antimicrobica: definizione, meccanismi, sorveglianza, valutazione e rischio per la salute umana;
3. resistenza naturale *versus* resistenza acquisita;
4. fenotipi di resistenza innata dei microrganismi clinicamente più rilevanti;
5. linee guida attuali relative ai test di suscettibilità antimicrobica e al loro uso nella pratica clinica;
6. metodi per le indagini di suscettibilità antimicrobica: test di discodiffusione, di diffusione in agar, test di microdiluzione in brodo, epsilometro test (E-Test);
7. agenti antimicrobici emergenti, ad esempio antimicrobici nuovi o tornati in uso, batteriofagi, iRNA, vaccini, sieroterapia, strategie anti-patogenetiche (ad esempio inibitori del sistema "quorum sensing" microbico), strategie antimicrobiche fisiche basate su agenti fisici (plasma freddo, terapia fotodinamica);
8. valore della "stewardship" antimicrobica.

### B3.6 Epidemiologia e protezione della salute

1. Sorveglianza e segnalazione delle malattie trasmissibili;
2. ruolo dei servizi e delle tecniche di laboratorio a supporto dell'indagine epidemiologica;
3. i principi di prevenzione, investigazione e gestione dei focolai d'infezione;
4. standard e linee guida in relazione all'esposizione professionale ad agenti infettivi;
5. conseguenze epidemiologiche del controllo delle malattie acquisite in ospedale e nelle comunità con riferimento a tubercolosi, epatite virale, HIV e malattie genito-urinarie;
6. gestione delle lesioni da puntura di ago nel contesto clinico;
7. decontaminazione, disinfezione e sterilizzazione in ospedale, in laboratorio e negli ambienti di assistenza primaria;
8. principi di screening per alcuni organismi, ad esempio *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), Gram negativi multi-resistenti, inclusi enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE), enterococchi resistenti alla vancomicina;
9. sicurezza idrica nell'ambito dell'assistenza sanitaria, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium chimaera*;
10. protocolli investigativi e percorsi adeguati per i pazienti in merito ad infezioni acquisite in ospedale e in comunità;
11. focolai ambientali, ad esempio *Legionella*, *Norovirus*;
12. importanza della tutela della salute e delle agenzie di sorveglianza.

### B3.7 Salute pubblica nel mondo: implicazioni per la microbiologia clinica

1. Agenti patogeni coinvolti nelle infezioni derivate da cibo e acqua;
2. cause comuni di infezione nei viaggiatori che ritornano da Paesi endemici (ad esempio malaria, febbre emorragica virale);
3. epidemiologia, distribuzione e ricerca di infezioni

tropicali comuni (ad esempio malaria, tubercolosi, febbre enterica, colera, dissenteria, schistosomiasi, oncocercosi, tripanosomiasi, parassiti del tratto gastrointestinale, dengue, febbre gialla);

4. epidemiologia, distribuzione, ricerca e gestione dell'influenza pandemica e di altre malattie infettive globali. Il ruolo dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), dei governi e dei fornitori di servizi sanitari;
5. bioterrorismo e misure per ridurre il rischio.

#### **B4: Genetica, genomica e citogenetica**

1. Struttura e funzione degli acidi nucleici;
2. struttura cromosomica, funzione e anomalie (ad esempio sindrome di Down, anomalie dei cromosomi sessuali, traslocazioni);
3. nomenclatura usata per descrivere il genoma umano;
4. replicazione, trascrizione e traduzione del DNA;
5. meiosi, mitosi e eredità mendeliana;
6. modelli di ereditarietà (autosomica, legata al cromosoma X, non mendeliana);
7. utilizzo di strumenti per l'analisi del genoma, ruolo della bioinformatica nella ricerca e nella gestione di disordini genetici e genomici;
8. disturbi genetici e genomici comuni e il loro impatto sul paziente e le loro famiglie;
9. basi scientifiche delle neoplasie ereditarie e sporadiche;
10. principi e pratica della consulenza genetica.

#### **B5: Fecondazione *in vitro***

1. Conoscenza di base del conteggio degli spermatozoi, vitalità, mortalità e morfologia degli spermatozoi;
2. conoscenza di base per la preparazione di sperma fresco e congelato;
3. comprensione dei fattori che influenzano la qualità degli ovociti;
4. comprensione del contributo delle indagini di medicina di laboratorio nella valutazione della fertilità, nella valutazione delle opportunità di fecondazione *in vitro* e nel monitoraggio della gravidanza;
5. crioconservazione di gameti (sperma e ovociti) e di embrioni, e aspetto teorico e pratico del raffreddamento lento e della vetrificazione.

### **C. RICERCA, SVILUPPO E REVISIONE**

Obiettivo formativo: entro la fine del percorso formativo, uno specialista in Medicina di Laboratorio dovrà essere in grado di pianificare, condurre, supervisionare, valutare clinicamente, interpretare e riportare i risultati di una ricerca, dello sviluppo futuro del laboratorio clinico e delle modalità di audit. Gli esempi includono ricerche originali, trasposizione dei risultati delle ricerche nella pratica e adozione e diffusione di innovazioni nella pratica clinica. Poiché la medicina di laboratorio è in continua e rapida evoluzione, il coinvolgimento dei professionisti nella ricerca, nello sviluppo e nella successiva revisione è indispensabile.

Un'attenzione particolare deve essere rivolta a quanto segue:

1. sviluppo e miglioramento di tecnologie, tecniche e metodi; con particolare attenzione ai nuovi sviluppi in settori quali la biologia molecolare, la proteomica, la spettrometria di massa;
2. procedure per verificare e valutare le fasi di un metodo e le parti integranti di uno strumento;
3. avvio, gestione e valutazione di una ricerca clinica e di laboratorio e suo sviluppo basato sulle migliori prove di evidenza;
4. avviare, condurre e valutare le verifiche di qualità all'interno del laboratorio per garantire che la qualità, la governabilità e le esigenze dei pazienti continuino ad essere soddisfatte;
5. generare risultati di ricerca e sviluppo, di controllo e miglioramento del servizio utilizzando tecniche scientifiche e statistiche riconosciute.

#### *Competenze*

- Capacità di condurre una ricerca, sia di base che applicata, al fine di approfondire le conoscenze nel campo della medicina di laboratorio;
- capacità di scrivere revisioni sistematiche o narrative e capacità di progettare programmi quantitativi e qualitativi finalizzati alla ricerca, allo sviluppo, alla revisione e al miglioramento del servizio sulla base delle migliori evidenze;
- capacità di valutare le necessità e stabilire le priorità per programmi di ricerca, sviluppo, revisione e miglioramento del servizio;
- comprensione della governabilità della ricerca, dei quadri etici e legali, dei flussi di finanziamento, dell'influenza del quadro normativo delle organizzazioni sanitarie nei contesti locali;
- capacità di progettare e condurre gli esperimenti richiesti per garantire che gli obiettivi siano soddisfatti;
- applicazione di procedure statistiche e biostatistiche per la valutazione delle informazioni e dei dati quantitativi e qualitativi;
- capacità di valutare e tradurre i risultati per migliorare le attività, secondo le priorità;
- capacità di comunicare oralmente e per iscritto, compresa la stesura di articoli e pubblicazioni chiari e convincenti su riviste scientifiche internazionali.

### **D. FUNZIONI DIRIGENZIALI**

Obiettivo formativo: operare come leader clinico supportando e riformando i servizi di assistenza sanitaria. A seconda dell'ambiente di lavoro, lo specialista in medicina di laboratorio dovrà avere familiarità con alcuni o con tutti gli aspetti delle responsabilità elencate di seguito.

#### **D1: Direzione di laboratorio**

1. Specificare i requisiti del servizio;
2. formulare la strategia e stabilire la politica;
3. progettare laboratori;

4. valutare i requisiti delle risorse: personale, spazio, attrezzature;
5. analisi dei costi (efficienza) e dei costi-benefici (efficacia).

### **D2: Organizzazione del laboratorio**

1. Progettazione e utilizzo di spazi e strutture;
2. selezione di metodologie e attrezzature;
3. gestione del flusso delle informazioni e dei sistemi tecnologici;
4. reclutamento e gestione appropriata di personale eterogeneo e con competenze diversificate per le differenti funzioni;
5. stabilire i processi pre-analitici, analitici e post-analitici;
6. preparazione dei protocolli, delle procedure e delle linee guida;
7. stesura di accordi aziendali, di piani strategici e contratti di servizio;
8. responsabilità di bilancio (contratti, gestione delle prestazioni, controlli finanziari);
9. progettazione delle modalità di richiesta e di refertazione.

### **D3: Qualità**

1. I criteri e il processo di accreditamento di un laboratorio;
2. laboratorio medico e vicino al malato ("point of care testing");
3. gestione del rischio e procedure adottate per ridurre al minimo i rischi;
4. requisiti per un sistema di gestione della qualità: garanzia della qualità, governabilità, monitoraggio delle azioni programmate, revisione, segnalazione degli incidenti;
5. gestione del controllo di qualità interno e prestazioni nella valutazione esterna della qualità;
6. gestione dei dati, delle informazioni e delle conoscenze: uso dell'informatica medica, elaborazione dei dati, fogli elettronici/banche dati, elettronica/telecomunicazioni.

### **D4: Istruzione/formazione/aggiornamento professionale continuo**

1. Dimostrare una buona capacità di comunicazione, tutoraggio, supervisione e valutazione delle competenze;
2. essere in grado di pianificare e preparare il materiale didattico utilizzando informazioni e dati basati sull'evidenza;
3. partecipare alle attività didattiche e ai metodi di valutazione;
4. possedere una buona conoscenza del contesto clinico prima di insegnare o addestrare gli altri;
5. comprendere le diverse modalità di insegnamento e guida sia dal punto di vista dello studente che del docente;
6. garantire che le capacità, le competenze e le motivazioni del personale soddisfino i requisiti di

- servizio;
7. garantire al personale la partecipazione a programmi di istruzione e formazione adeguati alle esigenze di servizio;
8. partecipare, quando risulta appropriato, all'istruzione, alla formazione e alla valutazione del personale;
9. assicurare che il personale sia aggiornato grazie alla partecipazione a programmi di educazione professionale continua;
10. devono inoltre, essere mantenute le proprie esigenze di formazione, istruzione, di valutazione e di CPD.

### **D5: Salute e sicurezza del laboratorio**

1. Manipolazione di campioni potenzialmente infettivi (ad esempio HIV ed epatite), manipolazione di sostanze chimiche nocive e isotopi, sicurezza meccanica ed elettrica, precauzioni antincendio, trattamento degli incidenti, prevenzione degli infortuni e norme igieniche, malattie del lavoro;
2. consapevolezza di tutte le norme legali e la regolamentazione del servizio di assistenza sanitaria, che devono essere soddisfatte per garantire la conformità con le pratiche di sicurezza e il mantenimento dello stato di accreditamento;
3. sistemi di allarme, segnalazione di incidenti.

### **D6: Considerazioni legali, etiche e sulla struttura di governo**

1. Conoscere leggi, regolamenti, linee guida e raccomandazioni sulle modalità di lavoro nei laboratori clinici: in particolare i requisiti per l'accreditamento dei servizi, istruzione e formazione, salute e sicurezza, controllo delle infezioni, strutture degli edifici, diritto del lavoro, regolamentazione e registrazione del personale;
2. conoscere aspetti etici e consensi (informati) sulla produzione, l'interpretazione, la refertazione e l'uso dei dati del laboratorio medico;
3. garantire la riservatezza, la protezione e la sicurezza dei dati;
4. conoscere le aspettative di "governance" clinica e della ricerca da parte delle istituzioni, delle organizzazioni legate all'assistenza sanitaria e dei datori di lavoro, per un'assistenza di alta qualità basata sull'evidenza.

### *Competenze*

- Abilità di salvaguardare e proteggere il pubblico dall'uso improprio delle indagini di laboratorio;
- conoscenza dei principi di gestione, che conducono ad avere una direzione, supervisione e organizzazione soddisfacenti di un dipartimento di laboratorio, in un ospedale pubblico o privato o in qualsiasi altro ambiente sanitario, al fine di fornire un servizio adeguato, come stabilito nel manuale della qualità di laboratorio, basato sui buoni servizi di laboratorio definiti nel documento EN-ISO 15189;
- capacità di determinare la distribuzione ottimale delle

risorse tra i laboratori centrali, le sedi periferiche e POCT;

- capacità di valutare considerazioni opposte e varie considerazioni tecniche, finanziarie e umane (ad esempio, cura, qualità, sicurezza, costi e tempi) sia a breve che a lungo termine e di trovare la soluzione ottimale in relazione alla cura del paziente;
- capacità di applicare le tecniche attuali nella gestione delle risorse umane;
- capacità di esercitare valutazioni oggettive e dirigenziali.

### D7: Pratica professionale e competenze relazionali

Obiettivo della formazione: dimostrare adeguate conoscenze, capacità e attitudini appropriate per lavorare in modo ampiamente autonomo e capacità di prendere l'iniziativa in situazioni complesse e eseguire attività complesse sia cliniche che di ricerca entro la fine del periodo di formazione di 5 anni.

Lo specialista in medicina di laboratorio deve sviluppare competenze sufficienti per comunicare facilmente con i pazienti, colleghi clinici e di altra specialità, e sviluppare competenze per scrivere articoli significativi. Infine, lo specialista in medicina di laboratorio dovrà essere in grado di valutare criticamente la letteratura e di discuterne i risultati con i colleghi per iscritto o verbalmente.

I nuovi specialisti in Medicina di Laboratorio dovranno:

- possedere ampie conoscenze e competenze per assumersi la responsabilità di decisioni cliniche sicure;
- avere l'auto-consapevolezza di riconoscere i limiti delle loro competenze e, quando opportuno, fare riferimento ad altri colleghi più esperti per un consiglio;
- esercitare criticamente il proprio ruolo e conoscere l'importanza dell'educazione continua professionale per garantire che le conoscenze e le competenze professionali vengano mantenute;
- agire in ogni momento in modo tale da dimostrare la propria integrità in tutti gli aspetti della pratica professionale e del codice di condotta;
- mostrare un impegno professionale per un comportamento etico che sia costantemente in accordo ai requisiti etici, legali e governativi nazionali e locali.

### RINGRAZIAMENTI

Gli autori della versione 5 del Syllabus, riconoscono il contributo storico di "European Communities Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine" (EC4) alle precedenti versioni da 1 a 4, che hanno contribuito ad unificare le aspettative per l'educazione e la formazione e hanno identificato le conoscenze, le capacità e le competenze associate alla professione della Medicina di Laboratorio.

I traduttori ringraziano il dr Matteo Vidali per la consulenza prestata alla traduzione della sezione dedicata ai metodi statistici.

### BIBLIOGRAFIA

1. Cambridge English Dictionary & Thesaurus. Syllabus. Cambridge English Dictionary & Thesaurus [serial on the Internet]. Available from: <http://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/syllabus?q=Syllabus>.
2. European Parliament and EU Council. Directive 2013/55/EU of the European Parliament and of the Council of 20 November 2013 amending Directive 2005/36/EC on the No 1024/2012 on administrative cooperation through the Internal Market Information System ('the IMI Regulation') 2013: Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2013:354:TOC>.
3. European Commission Press release. Commissioner Michel Barnier welcomes the trilogue agreement on the modernisation of the Professional Qualifications Directive. Memo [serial on the Internet]. 2013: Available from: [http://europa.eu/rapid/pressrelease\\_MEMO-13-552\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/pressrelease_MEMO-13-552_en.htm).
4. Wieringa G, Zerah S, Jansen R, Simundic AM, Queralto J, Solnica B, et al. The EC4 European syllabus for post-graduate training in clinical chemistry and laboratory medicine: version 4 – 2012. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1317–28.
5. McMurray J, Zerah S, Hallworth M, Koeller U, Blaton V, Tzatchev K, et al. The European Register of Specialists in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: Code of Conduct, Version 2 – 2008. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:372–5.
6. McMurray J, Zerah S, Hallworth M, Schuff-Werner P, Haushofer A, Szekeres T, et al. The European Register of Specialists in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: guide to the Register, version 3 – 2010. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:999–1008.
7. NHS – Modernising Scientific Careers. HSST – Higher Specialist Scientist Training. Curricula for the Higher Specialist Scientist Training Programme NHS UK, 2016.
8. Simundic AM, Topic E, Cvoriscec D, Cepelak I. Clinical chemistry and laboratory medicine in Croatia: regulation of the profession. *Biochem Med (Zagreb)* 2011;21:15–21.
9. Smith BR, Wells A, Alexander CB, Bovill E, Campbell S, Dasgupta A, et al. Curriculum content and evaluation of resident competency in clinical pathology (laboratory medicine): a proposal. *Am J Clin Pathol* 2006;125(Suppl):S3–37.
10. The Royal College of Pathologists. Curriculum for specialty training in chemical pathology 2010; (G043): Available from: [http://www.gmc-uk.org/Chemical\\_Pathology\\_Curriculum\\_AR.pdf\\_33506735.pdf](http://www.gmc-uk.org/Chemical_Pathology_Curriculum_AR.pdf_33506735.pdf).
11. ISO 15189:2012 Medical laboratories – Requirements for quality and competence. Available from: <https://www.iso.org/standard/56115.html>.

## Raccomandazioni per l'ottimizzazione della fase pre-analitica per una corretta determinazione della glicemia in ambito diabetologico

Graziella Bonetti<sup>1</sup>, Mariarosa Carta<sup>2</sup>, Annunziata Lapolla<sup>3</sup>, Roberto Miccoli<sup>4</sup>, Roberto Testa<sup>5</sup>, Andrea Mosca<sup>6</sup> in qualità di delegati SIBioC, Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) e Società Italiana di Diabetologia (SID) e per il Gruppo di Studio SIBioC-SIPMeL Diabete Mellito

<sup>1</sup>Laboratorio Centrale Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Sanitaria Socio Territoriale - Spedali Civili, Brescia

<sup>2</sup>Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi, Padova

<sup>4</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione Diabetologia e Malattie Metaboliche, Università degli Studi, Pisa

<sup>5</sup>Laboratorio analisi chimico-cliniche e molecolari, Istituto Nazionale di Ricovero e Cura per gli Anziani (INRCA), Ancona

<sup>6</sup>Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi, Milano

### ABSTRACT

**Correct determination of glycemia in the management of diabetes: recommendations for the optimization of the pre-analytical phase.** The time-dependent decrease of glucose in tubes after venipuncture may cause artificially lower values, if glycolysis is not appropriately inhibited by the correct anticoagulant. In this work we have extensively reviewed the current literature about the possible use of citrate buffer together with sodium EDTA and sodium fluoride. We conclude that, for screening and diagnosis of diabetes mellitus, including gestational diabetes, glucose has to be determined in plasma by using the above mentioned ternary mixture either as solid or in liquid state (in this case the correct numerical conversion factor has to be employed). For the measurement of glucose in patients with already known diabetes and following monitoring, lithium heparin tubes may be used providing that plasma separation should be rapidly performed. Alternatively, serum-separating tubes with particles promoting rapid clotting could also be employed.

### PREMESSA

La misura della glicemia a digiuno o dopo carico orale di glucosio è uno dei punti chiave della diagnosi di diabete e/o di alterata regolazione glicemica, e riveste inoltre un ruolo fondamentale anche nel monitoraggio del paziente diabetico (1, 2). Una glicemia accurata rappresenta anche uno dei parametri della classificazione del paziente (insieme ai marcatori di autoimmunità e al peptide C), oltre che della gestione clinica insieme alla misurazione della HbA<sub>1c</sub>.

La fase pre-analitica può essere però causa di numerosi problemi. Il prelievo per la glicemia deve essere eseguito alla mattina (3) dopo un digiuno di 8-12 ore (4). Il soggetto non deve presentare infezioni, febbre o aver subito recenti ospedalizzazioni se il prelievo viene eseguito per screening. L'assunzione di alcool e caffè

deve essere evitata, così come il fumo di sigaretta, lo stress e gli sforzi fisici eccessivi (5) nei momenti che precedono il prelievo ematico.

Di fondamentale importanza è comunque la scelta dell'anticoagulante e del tipo di campione da analizzare. Esistono infatti significative differenze nei risultati ottenuti su campioni diversi (sangue intero, plasma, sangue capillare, siero). Le principali società scientifiche ed organismi professionali raccomandano di eseguire la misura della glicemia su plasma; la provetta andrebbe però posizionata in un bagno di acqua e ghiaccio fondente e centrifugata entro 30 minuti, oppure centrifugata immediatamente dopo il prelievo ed il plasma separato dalla parte corpuscolata (6). Questi accorgimenti sono necessari per bloccare la glicolisi che procede *in vitro* dopo il prelievo di sangue e che determina una diminuzione della glicemia pari al 6-7% all'ora.

\*Questo articolo è pubblicato simultaneamente da *Biochimica Clinica* e dalla *Rivista di Medicina di Laboratorio*.

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Università degli Studi di Milano, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate (MI). E-mail [andrea.mosca@unimi.it](mailto:andrea.mosca@unimi.it)

Ricevuto: 23.05.2018

Accettato: 04.06.2018

Pubblicato on-line: 14.06.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.037

Tuttavia spesso l'organizzazione dei laboratori non consente una rapida centrifugazione dei campioni. E' necessario allora ricorrere all'utilizzo di anticoagulanti in grado di inibire gli enzimi della glicolisi. Tra i più utilizzati ancora oggi a questo scopo vi è il fluoruro di sodio (NaF) che però inibisce un enzima situato nella parte distale della glicolisi, l'enolasi. Gli enzimi posizionati nella parte iniziale della via glicolitica restano attivi, la fosforilazione dei glucidi continua finché l'adenosin trifosfato (ATP) non si esaurisce e questo causa un consumo del glucosio. Quindi, anche in presenza di NaF, il blocco della glicolisi non avviene nelle prime due ore dalla raccolta del campione, come dimostrato da numerosi studi. Infatti, la concentrazione del glucosio diminuisce gradualmente e la sua stabilizzazione si ha solo dopo 90-120 minuti dal prelievo (7).

E' stato quindi proposto l'utilizzo di provette contenenti tampone citrato: l'acidificazione del campione blocca istantaneamente l'esochinasi e la fosfofruttochinasi, enzimi che agiscono precocemente nella via glicolitica (8). Anche se viene riportato un lieve decremento della glicemia dopo 24 ore (9), è stato descritto in recenti studi come tale inibizione possa durare fino a 96 ore a temperatura ambiente (10).

L'utilizzo di provette contenenti acido citrico e NaF (per garantire comunque una inibizione a lungo termine) è stato raccomandato dalla National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) nel 2011 in tutti quei casi in cui non può essere assicurata una pronta centrifugazione del campione (6), mentre l'utilizzo delle provette contenenti solo NaF viene scoraggiato in quanto garantisce solo una inibizione tardiva della glicolisi. La miscela acidificata, contenente tampone citrato, NaF e Na<sub>2</sub>EDTA, raccomandata dalla NACB era presente in forma liofila in provette già validate in numerosi studi (8-11), ma ora non più disponibili in commercio. Tale miscela è presente in forma liquida in altre provette che hanno mostrato inibire in maniera efficace e pronta la glicolisi (12). Tuttavia è necessario che le provette vengano riempite correttamente e che si utilizzi un opportuno fattore di conversione indicato dal produttore per correggere l'effetto di diluizione.

Recentemente è stata proposta una nuova provetta contenente tampone citrato, NaF ed EDTA. La provetta con miscela ternaria acidificata è dedicata alla determinazione della glicemia. Questa provetta ha dimostrato una efficacia analoga alla precedente provetta, ora non più disponibile, nello stabilizzare la glicemia fino a 48 ore (13). Il suo utilizzo è stato validato anche nell'esecuzione della curva da carico orale di glucosio (OGTT) nello screening del diabete gestazionale (14), confrontandole con le provette contenenti NaF-ossalato utilizzate nello studio "Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes (HAPO)", studio che è servito per stabilire i valori decisionali per la diagnosi di diabete gestazionale (15).

In seguito ad una revisione sistematica della letteratura (16), il Working Group sulla Fase Pre-analitica di EFLM ha di recente indicato come l'impiego delle provette con miscela acidificata rappresenti un'unica opportunità ed un considerevole passo avanti verso il raggiungimento di determinazioni più accurate ed attendibili della glicemia.

## SINTESI DELLE RACCOMANDAZIONI

Per lo screening e la diagnosi del diabete mellito, compreso il diabete gestazionale:

1. Il soggetto deve essere a digiuno da almeno 8 ore e non oltre le 12 ore. Non deve aver presentato di recente febbre, infezioni acute o aver subito recenti traumi o interventi chirurgici.
2. La determinazione della glicemia deve essere eseguita su plasma con metodo enzimatico.
3. Deve essere ottenuto un efficace blocco della glicolisi mediante l'impiego di uno dei seguenti metodi:
  - a. posizionando la provetta in acqua con ghiaccio fondente e centrifugandola entro 30 minuti, oppure
  - b. centrifugando immediatamente la provetta e separando il plasma dalla parte corpuscolata, oppure
  - c. impiegando, qualora i procedimenti e i tempi di cui sopra non possano essere rispettati, un anticoagulante in grado di svolgere una rapida e duratura inibizione della glicolisi (NaF, tampone citrato, EDTA), presente in forma liofila oppure in forma liquida (in tal caso sarà applicato un opportuno fattore di conversione<sup>a</sup>).
4. Nelle condizioni di cui sopra la glicemia è stabile per 48 ore a temperatura ambiente, 24 ore a 37 °C e per 3 giorni a 4-6 °C.

Per la misura della glicemia ai fini del monitoraggio del controllo glicemico nel paziente con diabete noto si possono continuare ad utilizzare provette con litio-eparina con rapida centrifugazione e analisi o siero con acceleratore della coagulazione e gel separatore.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2017;10:S11-24.
2. Standard Italiani per la cura del diabete mellito 2016. [www.standarditaliani.it](http://www.standarditaliani.it) (ultimo accesso: giugno 2018)
3. Troisi RJ, Cowie CC, Harris MI. Diurnal variation in fasting plasma glucose. *JAMA* 2000;284:3157-9.
4. Statland BE, Winkel P. Response of clinical chemistry quantity values to selected physical, dietary, and smoking activities. *Prog Clin Pathol* 1981;8:25-44.

<sup>a</sup>Il fattore di correzione indicato sulle provette dall'azienda che produce la miscela ternaria in forma liquida è 1,16.

5. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, et al. Samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. 4<sup>th</sup> ed. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2009:6-14.
6. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendation for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34:e61-9.
7. Gambino R. Sodium fluoride: an ineffective inhibitor of glycolysis. *Ann Clin Biochem* 2013;50:3-5.
8. Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA, et al. Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clin Chem* 2009;55:1019-21.
9. Fobker M. Stability of glucose in plasma with different anticoagulants. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1057-60.
10. Winter T, Greiser A, Nauck M, et al. Long-term stability of glucose: 96-h study using Terumo Glycaemia tubes. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:407-10.
11. Bonetti G, Carta M, Montagnana M, et al. Effectiveness of citrate buffer-fluoride mixture in Terumo tubes as an inhibitor of in vitro glycolysis. *Biochem Med* 2016;26:68-76.
12. Bonetti G, Cancelli V, Coccoli G, et al. Which sample tube should be used for routine glucose determination? *Prim Care Diabetes* 2016;10:227-32.
13. Bonetti G, Carta M. The new Greiner FC-Mix Tubes equal the old Terumo ones and are useful as glucose stabilizer after prolonged storage of samples. *Biochem Med* 2017;27:584-9.
14. van der Hagen EAE, Fokkert MJ, Kleefman AMD, et al. Technical and clinical validation of the Greiner FC-Mix glycaemia tube. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1530-6.
15. HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991-2002.
16. Lippi G, Nybo M, Cadamuro J, et al. Blood glucose determination: effect of tube additives. *Adv Clin Chem* 2018;84:101-23.

## Efficacia e utilità del monitoraggio terapeutico di autoanticorpi e farmaci inibitori del Tumor Necrosis Factor alpha in pazienti in trattamento per patologie autoimmuni

Valentina Pecoraro<sup>1</sup>, Tommaso Trenti<sup>1</sup>, Chiara Bonaguri<sup>2</sup>, Alessandra Melegari<sup>1</sup>, Elena De Santis<sup>1</sup>, Bruna Lo Sasso<sup>3</sup>, Umberto Basile<sup>4</sup> per il Gruppo di Studio SIBioC Autoimmunità e Immunologia Clinica

<sup>1</sup>Medicina di Laboratorio - Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata "Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica", Ospedale Civile S. Agostino Estense, Modena

<sup>2</sup>Laboratorio di Chimica Clinica e Ematologia, Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma, Parma

<sup>3</sup>Biochimica Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università di Palermo, Palermo

<sup>4</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio Università Cattolica del Sacro Cuore Roma

### ABSTRACT

**Therapeutic monitoring of autoantibodies Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  inhibitor drugs: efficacy and benefit for patients with autoimmune diseases.** Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) is a proinflammatory cytokine involved in the pathogenesis of chronic inflammatory disease, such as rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, Chron's disease and ulcerative colitis. TNF $\alpha$  inhibitors (anti-TNF $\alpha$ ) are monoclonal antibodies drugs directed against TNF $\alpha$  (i.e. adalimumab, infliximab, etanercept, golimumab and certolizumab). Their effect consists in reducing the inflammatory response of autoimmune diseases. Several randomized controlled trials and observational studies evaluated the therapeutic efficacy of these drugs and reported a clear benefit for patients affected by chronic inflammatory disease treated with anti-TNF $\alpha$ , but also a high risk of reactions and infections in the injection site. These drugs are immunogenic, and consequent anti-drug antibodies (ADA) formation may decrease the functional drug concentration resulting in a loss of response. Therefore, we evaluated the impact of ADA on therapeutic response through meta-analyses, showing that detectable ADA significantly reduced TNF $\alpha$  inhibitors response. ADA could interfere with drugs and compromise their effects, so the determination of serum ADA levels could improve the patient's management. Even if the decrease of therapeutic response, due to ADA production, is well documented, the clinical benefit of serum ADA determination remains unclear. At the moment, there are many indications about the use of immunogenicity test to guide the therapy, but more information should be acquired before implementing this test in clinical practice.

### INTRODUZIONE

Il fattore di necrosi tumorale alfa ("Tumour necrosis factor alpha", TNF $\alpha$ ) è membro di una famiglia di citochine coinvolte in una serie di meccanismi regolatori, come l'infiammazione, la citotossicità e l'adesione cellulare (1). In alte concentrazioni, il TNF $\alpha$  è coinvolto nella patogenesi di alcune patologie infiammatorie croniche, quali l'artrite reumatoide (RA), la colite ulcerosa (UC), la malattia di Crohn (CD), l'artrite psoriasica (PsA) e la spondilite anchilosante (AS). Gli inibitori del TNF $\alpha$  sono anticorpi

monoclonali (mAbs) che legano il TNF $\alpha$  neutralizzando i suoi effetti pro-infiammatori (2). I farmaci inibitori del TNF $\alpha$  sono infliximab (IFX), adalimumab (ADL), golimumab (GOL), etanercept (ETA), e certolizumab (CTZ). Una delle caratteristiche di questi anticorpi monoclonali è l'immunogenicità, ovvero la capacità di generare anticorpi anti-farmaco (anti-drug antibodies, ADA) in grado di neutralizzare le attività pro-infiammatorie e immunoattivanti del TNF $\alpha$  con conseguente perdita di risposta clinica (3, 4). Data la riduzione della risposta terapeutica dovuta alla produzione di ADA, il monitoraggio

Corrispondenza a: Tommaso Trenti, Laboratorio di Tossicologia, Dipartimento Internazionale ad Attività Integrata "Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica", Ospedale Civile S. Agostino Estense, Via Giardini 1355, 41126 Modena. Tel. 0593961467; Fax 0593961249; E-mail t.trenti@ausl.mo.it

Ricevuto: 18.04.2018

Accettato: 03.05.2018

Pubblicato on-line: 18.07.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.043

delle concentrazioni sieriche di ADA e di farmaco può essere utile sia nella scelta di un'appropriate strategia terapeutica, soprattutto per i pazienti che non rispondono al trattamento, sia nell'identificazione dei pazienti che potrebbero trarre vantaggio dalla modifica della terapia in atto.

## IL FATTORE DI NECROSI TUMORALE

Il TNF $\alpha$  è una citochina pleiotropica che fa parte di una superfamiglia di proteine, la superfamiglia TNF, che comprende molecole implicate nella regolazione delle reazioni infiammatorie e immunitarie, proliferazione cellulare, apoptosi (linfotossine, "first apoptosis signal" - Fas, il fattore regolatore dei linfociti B, CD40, "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells" - NF $\kappa$ B) e modulano la biosintesi e il rilascio di vari fattori molecolari e mediatori cellulari (1, 5). Il TNF $\alpha$  è una citochina pro-infiammatoria, regola effetti patogenici diretti e induce la produzione di altri mediatori di infiammazione e distruzione tissutale. Dato il suo ruolo nella difesa dell'ospite contro alcune infezioni batteriche, è denominata anche citochina sentinella (5, 6). È secreta principalmente dai macrofagi, ma anche dai linfociti T, mastociti, granulociti, cellule "natural killer", fibroblasti, neuroni, cheratinociti e cellule muscolari lisce in seguito a vari stimoli provenienti da batteri, virus, complessi immunitari, citochine, fattori del complemento, cellule tumorali, radiazioni ed anche in condizioni di ischemia, ipossia o traumi (5, 6).

La molecola del TNF $\alpha$  è costituita da tre subunità polipeptidiche identiche (omotrimerico), è espressa sulla superficie della membrana cellulare (TNF transmembrana, tmTNF, 26kDa), oppure è presente negli spazi transmembrana e nel circolo ematico in forma solubile (sTNF, 17 kDa) in seguito a clivaggio del suo precursore tmTNF ad opera dell'enzima "TNF $\alpha$  converting enzyme" (TACE). Entrambe le forme, quella solubile e quella transmembrana, sono biologicamente attive. TNF $\alpha$  può essere presente anche in forma monomerica solubile, biologicamente non attiva, la quale può assemblarsi con altri monomeri e formare molecole trimeriche biologicamente attive (7, 8). Il TNF $\alpha$  svolge i suoi effetti legandosi a due tipologie di recettori, il tipo 1 (TNFR1 o p55) e il tipo 2 (TNFR2 o p75), espressi sulla superficie delle cellule immunitarie, infiammatorie ed endoteliali. Entrambi i recettori sono glicoproteine di membrana che legano in maniera specifica sia il TNF $\alpha$ , sia le linfotossine, ma differiscono per struttura cellulare, affinità per i ligandi e meccanismi di trasduzione del segnale (2, 7, 8). Il TNFR1 lega preferenzialmente il sTNF ed è espresso sulla superficie di tutti i tipi cellulari, tranne gli eritrociti. Il TNFR2, invece, lega preferenzialmente il tmTNF ed è espresso soprattutto sulle cellule endoteliali ed emopoietiche. Inoltre, entrambi i recettori possono essere clivati dalla membrana plasmatica e rilasciati in circolo sotto forma di recettori solubili, in grado di legare TNF $\alpha$ . In questo modo agiscono come antagonisti, bloccando gli

effetti mediati dal TNF $\alpha$ . L'attivazione dei recettori espressi sulla membrana plasmatica delle cellule bersaglio, innesca l'attivazione di meccanismi pro-infiammatori. Inoltre il tmTNF $\alpha$  è in grado di innescare processi di segnalazione inversa ("reverse signaling"), e di attivare risposte antiinfiammatorie (8, 9).

## INIBITORI DEL TNF $\alpha$ NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE

TNF $\alpha$  quando è presente in alte concentrazioni, è coinvolto nella patogenesi di alcune malattie infiammatorie croniche, quali l'AR, UC, AS, PsA, CD. In queste patologie il TNF $\alpha$  regola l'attivazione di alcune citochine (IL-1 $\beta$ , IL-6) e proteine della fase acuta (come ad esempio la proteina C reattiva) (7).

L'AR è una patologia infiammatoria cronica che colpisce circa 0,3-1,2% delle persone nel mondo, ed è caratterizzata dalla distruzione delle articolazioni fino all'erosione della cartilagine e dell'osso (10). Questa patologia è associata a progressiva disabilità, complicazioni sistemiche, morte precoce e conseguenti importanti costi socio-economici (11). L'origine rimane ancora sconosciuta, ma l'interazione tra fattori genetici e ambientali contribuisce all'instaurazione di questo stato infiammatorio cronico (10-12). I pazienti affetti da AR manifestano una condizione infiammatoria importante accompagnata da un elevato numero di macrofagi attivati, soprattutto in corrispondenza delle articolazioni, ma anche in altre sedi. I linfociti T attivati proliferano e migrano nell'articolazione dove stimolano una cascata molecolare immuno-infiammatoria. Producono, infatti, interferon  $\gamma$  e altre citochine pro-infiammatorie che a loro volta stimolano i macrofagi, fibroblasti, condrociti e osteoclasti. I macrofagi attivati secernono TNF $\alpha$ , ma anche interleuchine (IL) quali IL-1, IL-6, IL-15 e IL-18 e altre citochine che a loro volta stimolano la produzione di mediatori dell'infiammazione, proteasi e fattori di crescita e attivano i neutrofili e le cellule endoteliali. Questa trasformazione endoteliale perpetua la risposta immunitaria incrementando il reclutamento cellulare a livello dell'articolazione contribuendo al danno articolare (10, 11). Inoltre, alcune infezioni, come quelle del virus Epstein-Barr e citomegalovirus, sembrano essere associate alla patogenesi della malattia (11). In questo contesto i farmaci inibitori del TNF $\alpha$  rappresentano una scelta terapeutica importante per i pazienti affetti da AR. Ad oggi non esiste una terapia farmacologica in grado di curare definitivamente l'AR, quelle comunemente adottate prevedono la somministrazione di "Disease Modifying Antirheumatic Drugs" (DMARDs) ed hanno la funzione di ridurre i segni e i sintomi della malattia e rallentarne il decorso, oltre a dare sollievo al dolore (13). Gli inibitori del TNF $\alpha$  approvati per l'AR sono in grado di bloccare l'azione pro-infiammatoria del TNF $\alpha$  favorendo la risposta clinica, a fronte però di effetti avversi gravi quali infezioni, reazioni al sito di infusione, e la comparsa di ADA che ne neutralizzano l'effetto (10).

La psoriasi colpisce i giovani adulti ed è considerata una patologia a carattere multisistemico associato a multiple comorbidità tra cui disordini extra-cutanei come la PsA. Quest'ultima è un'artrite infiammatoria cronica associata a infiammazione della pelle e del tessuto sinoviale ed influenza molto la qualità della vita dei pazienti (14). Colpisce solitamente i giovani adulti nella terza e quarta decade di vita, in rari casi anche i bambini. Data la complessità della malattia e l'eterogeneità di manifestazioni, spesso la diagnosi è tardiva. Le cause non sono ancora del tutto chiare ma fattori genetici ed ambientali contribuiscono all'insorgenza della malattia. I pazienti affetti da PsA manifestano solitamente disordini scheletrici, dolore ed infiammazioni delle articolazioni periferiche, spondiliti, entesiti, e in rari casi anche uveiti (15). I trattamenti attualmente approvati sono gli anti-infiammatori non steroidei, i DMARDS, gli steroidi intra-articolari e gli inibitori del TNF $\alpha$ .

La AS è una patologia infiammatoria cronica di origine sconosciuta che colpisce lo scheletro assiale causando mal di schiena e progressiva rigidità della spina dorsale (16). Colpisce soprattutto i giovani adulti prima dei 30 anni di età e la prevalenza varia tra 0,1% e 1% (17). Il processo infiammatorio alla base della malattia sembra essere scatenato dalla risposta immunitaria nei confronti delle strutture della cartilagine, confermata dalla presenza di linfociti T e B, macrofagi ed osteoclasti (16). Inoltre si è anche osservata un'alta concentrazione di TNF $\alpha$  nel siero, sinovio e articolazioni sacro-iliache dei pazienti affetti (18). La terapia farmacologica prevede la somministrazione di antinfiammatori per la gestione del dolore, e degli immunomodulatori per il controllo dell'infiammazione, oltre alla somministrazione di esercizi di fisioterapia. Il trattamento dei sintomi disabilitanti della malattia è migliorato con l'introduzione degli inibitori del TNF $\alpha$ , in particolare in seguito a somministrazione di ETA (18).

Le patologie infiammatorie dell'intestino comprendono la CD e la UC, entrambe caratterizzate da un'infiammazione cronica del tratto gastrointestinale (19, 20).

CD è una patologia sistemica che colpisce vaste aree del tratto gastrointestinale e l'infiammazione è solitamente disomogenea. L'incidenza va da 0,003 a 15,6 casi e la prevalenza da 3,6 a 214 casi per 100.000 persone per anno (20). Si manifesta con dolori addominali, diarrea, febbre, nausea, vomito e ostruzione intestinale con passaggio di sangue o muco (19). Colpisce solitamente i giovani adulti. I fattori scatenanti la risposta immunitaria a carico della mucosa intestinale sono ancora da chiarire. Si verifica più di frequente in seguito ad una gastroenterite da infezione con incremento della carica batterica presente nella mucosa gastrointestinale (19). Un ruolo chiave è rivestito dai macrofagi attivati che rilasciano citochine pro-infiammatorie che mediano la risposta infiammatoria, la quale cronicizza. Le terapie farmacologiche adottate hanno lo scopo di mantenere la malattia in una fase di remissione e controllare l'infiammazione e comprendono la somministrazione di corticosteroidi, aminosalicilati, immunomodulatori e gli inibitori del TNF $\alpha$  (IFX, ADL e CTZ) (19). UC è solitamente

circoscritta al colon e caratterizzata da un'infiammazione cronica della mucosa. L'incidenza è calcolata da 1,2 a 20,3 casi per 100.000 persone ogni anno, mentre la prevalenza è 7,6 a 246 per 100.000 persone ogni anno (20). Interessa generalmente la regione del retto, nel quale si osserva un infiltrato di polimorfonucleati neutrofilici a livello della mucosa e della sottomucosa, responsabili della progressiva distruzione epiteliale e della conseguente formazione di lesioni ulcerose. I pazienti possono manifestare dolore addominale e nei casi più gravi anche febbre, anemia e calo ponderale (20). L'eziologia dell'UC rimane sconosciuta, probabilmente intervengono fattori sia genetici sia ambientali, oltre a infezioni, che causano alterazioni della mucosa, e contribuiscono allo sviluppo del processo infiammatorio. Questo è mantenuto dall'aumentata espressione di citochine pro-infiammatorie. In questo contesto, il TNF $\alpha$  riveste un ruolo importante ed è presente in alte concentrazioni nel sangue dei pazienti (20). Le terapie farmacologiche adottate hanno lo scopo di regolare il processo infiammatorio in atto e prevedono la somministrazione di acido 5-aminosalicilico, steroidi, e negli ultimi anni è indicata anche la somministrazione di probiotici. Nelle forme più severe sono utilizzati gli inibitori del TNF $\alpha$ , IFX, ADL e GOL, in grado di indurre e mantenere la remissione clinica. Questi farmaci sono in grado di innescare l'apoptosi delle cellule immunitarie che esprimono TNF $\alpha$ , riducendo in questo modo la secrezione delle citochine pro-infiammatorie a valle (20).

## FARMACI INIBITORI DEL TNF $\alpha$

Gli inibitori del TNF $\alpha$  (anti-TNF $\alpha$ ) comprendono IFX, ADL, GOL, ETA e CTZ. Sono mAbs in grado di neutralizzare l'effetto pro-infiammatorio del TNF $\alpha$ .

IFX è stata la prima molecola approvata dalle agenzie regolatorie. IFX (Remicade) appartiene alla classe delle immunoglobuline di tipo G1 (IgG1). È un Abs chimerico (umano-murino), somministrato per via endovenosa, e lega sia il tmTNF sia l'sTNF anche in maniera bivalente, ovvero più molecole di TNF possono essere legate dallo stesso anticorpo. IFX è in grado di legare anche le forme monomeriche solubili di TNF $\alpha$ . ADL (Humira) e GOL (Simponi) sono anticorpi umanizzati, prodotti usando tecnologie del DNA ricombinante, e solitamente somministrati sottocute. ETA (Enbrel) è una proteina di fusione ingegnerizzata, costituita da un frammento Fc dell'immunoglobulina IgG1 umana, fusa con la porzione extracellulare del TNFR2 umano. Infine, CTZ (Cimzia) è un anticorpo ricombinante umanizzato in cui il frammento Fab dell'immunoglobulina è coniugato ad una molecola di polyethylene glycol (21).

Gli inibitori del TNF $\alpha$  legano la molecola TNF $\alpha$  trimerica, sia tmTNF $\alpha$  sia sTNF $\alpha$ , con grande affinità. Inoltre sono in grado di stabilire legami bivalenti o monovalenti con il TNF $\alpha$ , attivare processi di segnalazione inversa e indurre apoptosi. Il legame dell'mAb con il TNF $\alpha$ , interferisce con il legame del TNF $\alpha$  con i suoi recettori, TNFR1, TNFR2 e sTNFR, neutralizzandone gli effetti pro-infiammatori e inibendo

l'espressione dei geni coinvolti nei processi infiammatori (2).

Numerosi studi hanno dimostrato che questi farmaci consentono di ottenere risposte terapeutiche favorevoli nella fase di induzione e mantenimento della remissione clinica della malattia nel ~60-70% dei pazienti (22), ma in una considerevole parte dei pazienti gli inibitori del TNF $\alpha$  non risultano essere efficaci o i soggetti non tollerano la terapia data la possibile comparsa di eventi avversi, e vanno incontro ad un fallimento terapeutico primario. Inoltre, ~40% dei pazienti che inizialmente rispondono alla terapia, può andare incontro ad un fallimento terapeutico secondario, dovuto probabilmente alla somministrazione di un livello sub-terapeutico del farmaco, sviluppo di anticorpi antifarmaco o comparsa di mediatori dell'infiammazione (23). Di fronte ad un fallimento terapeutico, le strategie che possono essere perseguite per cercare di ottenere un effetto prevedono di (i) aumentare la dose del farmaco mantenendo inalterata la frequenza di somministrazione, (ii) aumentare la frequenza di somministrazione e non la dose, (iii) sostituire il primo farmaco con un altro farmaco anti-TNF $\alpha$ , (iv) sostituire il farmaco con un altro avente un meccanismo di azione differente rispetto all'inibizione del TNF $\alpha$  (3) pur a valenza immunosoppressiva, come ad esempio il methotrexate.

I farmaci inibitori del TNF $\alpha$  hanno differenti caratteristiche strutturali e funzionali, oltre a meccanismi di azione e proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche differenti che possono influenzarne i profili di efficacia e di sicurezza (Tabella 1). Il legame con il tmTNF $\alpha$  conferisce ad alcuni farmaci la capacità di attivare processi di segnalazione inversa, ovvero di comportarsi con il tmTNF non come antagonisti, ma come agonisti, e di indurre apoptosi o di sopprimere la produzione di citochine pro-infiammatorie nelle cellule che

esprimono il tmTNF.

Per quanto riguarda le proprietà farmacocinetiche, le differenze più importanti tra questi mAbs riguardano le dosi e le vie di somministrazione (endovenosa o sottocutanea), il tempo di emivita plasmatica, e il rapporto tra concentrazione massima e concentrazione minima (il cosiddetto "peak-trough ratio") del farmaco nel siero il cui valore dovrebbe essere mantenuto basso, in modo da garantire un adeguato livello di farmaco capace di neutralizzare l'effetto di TNF $\alpha$  (7).

Sebbene molti studi abbiano dimostrato che tutti i farmaci siano in grado di legare il TNF $\alpha$  con alta affinità, sono state riscontrate importanti differenze in merito alle loro cinetiche di legame e di dissociazione dal TNF; infatti, IFX e ADL hanno una velocità di dissociazione dal TNF $\alpha$  più lenta ed una affinità di legame tre volte più elevata rispetto agli altri farmaci (2, 7).

Gli inibitori del TNF $\alpha$  sono caratterizzati dalla capacità di scatenare la produzione di anticorpi diretti contro sé stessi (attività immunogena), i quali, legandosi agli inibitori del TNF $\alpha$ , bloccano l'interazione tra il farmaco e il TNF $\alpha$ , riducendo i livelli sierici del farmaco a volte al di sotto dei livelli minimi necessari per ottenere un'efficacia terapeutica (3, 24).

## IMMUNOGENICITÀ

Una delle caratteristiche dei farmaci inibitori del TNF $\alpha$  è la capacità di stimolare il sistema immunitario e generare anticorpi diretti contro il farmaco stesso, gli ADA. Questo fenomeno è conosciuto come immunogenicità (25). La produzione di ADA è causata dal fatto che epitopi diversi della molecola di anti-TNF $\alpha$  vengono riconosciuti come elementi estranei da parte del sistema immunitario, e si ritiene che questa tendenza sia maggiore nei farmaci contenenti frazioni murine rispetto a quelli costituiti da

**Tabella 1**  
Principali caratteristiche degli inibitori del TNF $\alpha$

	Infliximab	Adalimumab	Golimumab	Etanercept	Certolizumab
Struttura	Anticorpo monoclonale	Anticorpo monoclonale	Anticorpo monoclonale	Proteina di fusione P75TNFR/Fc	Anticorpo monoclonale PEG/ Fab
Ligando	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF and LT $\alpha$ 3	sTNF, tmTNF
Peso (kDa)	150	150	150	150	95
Vita media (giorni)	8-10	10-14	9 $\pm$ 15	3	14
Patologie approvate	CD, UC, RA, PsA, AS	CD, UC, RA, PsA, AS	RA, PsA, AS, UC	RA, AS, PsA	CD, RA
"Reverse signaling"	Alto	Alto	Moderato	Moderato	Moderato
Apoptosi	Alto	Alto	Moderato	Moderato	Moderato
Dosaggio	5 mg/kg	40 mg	50 mg	25-50 mg	400 mg
Somministrazione	Endovena	Sotto cute	Sotto cute	Sotto cute	Sotto cute
Frequenza (settimane)	8 settimane, poi dopo 0, 2-6 settimane	2	4	1	2

sTNF, tumor necrosis factor forma solubile; tmTNF, tumor necrosis factor forma trans-membrana; CD, malattia di Crohn; UC, colite ulcerosa; RA, artrite reumatoide; PsA, artrite psoriasica; AS, spondilite anchilosante.

molecole di origine umana. Inoltre, gli ADA prodotti possono essere di differenti isotipi (IgG, IgE, IgM) (23). La produzione di ADA è uno dei fattori che può determinare un fallimento terapeutico secondario, oltre a causare l'insorgenza di reazioni avverse da infusione, e determinare la neutralizzazione degli effetti terapeutici dei farmaci. Gli ADA agiscono legandosi al farmaco anti-TNF $\alpha$  formando un complesso che impedisce il legame del farmaco con le loro molecole bersaglio. In questo modo incrementano la clearance del farmaco riducendone la concentrazione funzionale con conseguente perdita di risposta (23). Gli ADA possono quindi interferire sia a livello farmacocinetico, riducendo le concentrazioni attive del farmaco anti-TNF $\alpha$ , sia a livello farmacodinamico, impedendo al farmaco anti TNF $\alpha$  di legarsi al TNF $\alpha$  per neutralizzarlo.

La determinazione degli ADA nel siero può quindi essere molto importante per la scelta di un'adeguata strategia terapeutica per i pazienti. Un recente studio riporta che la comparsa degli ADA potrebbe essere transitoria. Nei pazienti per i quali si rilevano modeste quantità di ADA, questi potrebbero scomparire in breve tempo, a differenza dei pazienti per i quali si determinano alte concentrazioni di ADA, i quali vanno incontro solitamente a interruzione del trattamento, o potrebbero richiedere modifiche del trattamento, eventualmente con aggiunta di immunosoppressori (26).

La somministrazione degli inibitori del TNF $\alpha$  può comportare la formazione di anticorpi neutralizzanti (infliximab, certolizumab, golimumab) o non neutralizzanti (eternacept). I diversi farmaci hanno un differente tasso di immunogenicità che varia a seconda della via di somministrazione del farmaco, della struttura molecolare, dose, terapie concomitanti, ma anche fattori genetici, età, sesso e caratteristiche della patologia. La produzione degli ADA è molto variabile tra i pazienti. L'IFX, essendo un anticorpo chimerico, dovrebbe essere più immunogenico rispetto agli anticorpi umanizzati. Il tasso di produzione di ADA in pazienti in terapia con IFX varia dal 6% al 61%, mentre, per i pazienti in terapia con ADL, oscilla tra 0,04% e 87%. La frequenza di ADA è inferiore con gli altri inibitori del TNF $\alpha$ , CTZ (3-25%), ETA (0-18%) e GOL (0-7%), riducendo anche l'associazione tra ADA e la risposta clinica (3).

## REVISIONE SISTEMATICA DELLA LETTERATURA

Per studiare l'effetto degli ADA sulla risposta terapeutica e clinica in pazienti affetti da patologie infiammatorie croniche, abbiamo condotto una revisione sistematica della letteratura (27). La revisione include 34 studi (4 studi randomizzati e 30 studi osservazionali). La nostra meta-analisi mostra che la presenza di ADA nel siero riduce la risposta al trattamento nel 57% dei pazienti trattati con ADL e IFX rischio relativo (RR) 0,43, 95% intervallo di confidenza (95% IC) da 0,3 a 0,63. L'analisi statistica effettuata tenendo conto del tipo di disegno di studio, metodo di determinazione, tipo di malattia, terapia

concomitante o pazienti che cambiano trattamento, riporta un'associazione ugualmente significativa. Inoltre i pazienti trattati con ETA, valutati in soli due studi, non sembrano sviluppare ADA. La produzione di ADA sembra essere associata anche al cambiamento della risposta clinica. Nei pazienti che sviluppano ADA, lo score sulla scala del "disease activity score 28" (DAS28) si riduce di circa un punto (MD 0,93; 95% IC da 0,41 a 1,44) e la concentrazione sierica del farmaco si riduce di circa 7 mg/L. Allo stesso modo, lo sviluppo di ADA si riduce di ~70% nei pazienti che rispondono al trattamento con gli inibitori del TNF $\alpha$  rispetto ai pazienti che non rispondono (RR 0,31; 95% IC da 0,18 a 0,52), e la concentrazione del farmaco era più alta di circa 3 mg/l. La terapia con gli inibitori del TNF $\alpha$  è associata anche ad un rischio aumentato di reazioni avverse al sito di iniezione, soprattutto nei pazienti in terapia con IFX somministrato per via endovenosa, e di infezioni serie come riportato anche in una precedente revisione sistematica (28).

Le evidenze disponibili suggeriscono che ci sono chiare differenze nella risposta al trattamento tra i pazienti che sviluppano ADA e quelli che non li producono. Per cui questo aspetto dovrebbe essere considerato quando si prendono decisioni cliniche al fine di apportare maggiori benefici ai pazienti.

Gli effetti degli ADA sull'efficacia degli inibitori del TNF $\alpha$  sono stati valutati anche in altre revisioni sistematiche i cui risultati sono concordanti con la nostra valutazione (29-32).

## IMPLICAZIONI DEI METODI PER LA QUANTIFICAZIONE DEGLI ADA E DEI FARMACI

I farmaci inibitori del TNF $\alpha$  sono determinati utilizzando principalmente metodi ELISA o RIA, ma anche utilizzando saggi enzimatici in fase liquida, o saggi che misurano la mobilità ("homogeneous mobility shift assay", HMSA) anche se non utilizzati comunemente nella pratica di laboratorio. L'elemento in comune che definisce la loro specificità è il rilevamento degli anticorpi utilizzati. Non c'è differenza tra saggi in fase liquida o solida in termini di concentrazione misurata del farmaco, ma è stata osservata una differenza nella specificità (26). Il vantaggio di usare anticorpi antifarmaco mono o policlonali è la specificità con cui legano il farmaco stesso, riducendo il numero di falsi positivi. Generalmente si suppone vi sia una buona correlazione tra le concentrazioni di farmaco misurati con le diverse metodiche (33) anche se pochi sono gli studi sperimentali.

Per quanto riguarda la determinazione degli ADA, il saggio più utilizzato è quello ELISA che permette di determinare i livelli di ADA in assenza di farmaco sierico. In presenza di farmaco nel siero, la determinazione degli ADA potrebbe essere inconclusiva. Per la determinazione degli ADA il metodo più impiegato è quello con il doppio antigene, in cui il farmaco è utilizzato sia per catturare che per rilevare gli anticorpi (33). Gli ADA possono essere determinati anche con saggi RIA o HMSA. Le metodiche in fase fluida, in questo caso, presentano maggiori

vantaggi, in quanto sono meno suscettibili all'interferenza dovuta alla presenza del farmaco nel siero (26). Il tasso di ADA riportato dipende non solo dalla metodica utilizzata, ma anche dal tipo di popolazione e in quale momento viene effettuato il campionamento.

Gli studi valutati nella nostra revisione sistematica utilizzano, per la quantificazione sia dei farmaci che degli ADA soprattutto metodi ELISA o RIA, i quali però non sono in grado di determinare tutti i tipi di anticorpi. Il principale limite di queste metodiche è il rischio di avere risultati falsi positivi, a causa del legame non specifico tra l'immunoglobulina e il farmaco, come riportato in un recente studio (34). Gli autori sottolineano che l'alta prevalenza di falsi positivi e l'assenza di associazione tra la formazione di ADA e le caratteristiche cliniche dei pazienti, limitano l'utilità di questi kit nella pratica clinica (34). Inoltre, in presenza di alte concentrazioni sieriche di farmaco, gli ADA liberi non vengono identificati correttamente (35). Infatti, gli ADA liberi legano il farmaco formando un complesso riducendo così i livelli di anticorpo libero che possono essere determinati (36).

Nonostante lo sviluppo di differenti metodiche per determinare sia il farmaco sia gli ADA, si è osservata l'assenza di standardizzazione tra i saggi, aspetto che contribuisce a limitare la riproducibilità dei risultati soprattutto tra laboratori. Questi kit mostrano differenti valori di accuratezza diagnostica, alcuni sono costruiti per piattaforme completamente automatizzate, ma potrebbero risentire dell'effetto matrice o cross reattività. Per cui risulta difficile confrontare i risultati ottenuti in laboratori diversi e questi potrebbero essere soggetti a misinterpretazioni. In commercio sono disponibili kit per la determinazione di ADA che utilizzano differenti anticorpi e diversi standard di riferimento. Con queste metodiche, la presenza di ADA dovrebbe essere riconfermata con un saggio successivo, in quanto questi ADA potrebbero essere transitori per quei pazienti in terapia di mantenimento o concomitante con immunosoppressori (23). Recentemente è stato sviluppato uno standard per gli anticorpi anti-ADL per favorire l'armonizzazione interlaboratorio, da utilizzare come calibratore per i differenti saggi e per standardizzare la quantificazione di ADA (37).

In questo contesto, la standardizzazione dei metodi analitici a disposizione è il primo passo necessario per poter implementare la determinazione dei farmaci e degli ADA nei laboratori clinici.

### **FATTORI CHE INFLUENZANO LE CONCENTRAZIONI SIERICHE DI FARMACO**

I meccanismi coinvolti nel fallimento terapeutico primario e secondario, non sono stati ancora bene definiti, ma alcuni fattori possono influenzare i livelli sierici di farmaco; tra questi il peso dei pazienti, il cui aumento comporta l'incremento della clearance del farmaco, il sesso maschile, e il "body mass index" (BMI) che risulta associato ad una riduzione del farmaco dovuta alla produzione di citochine pro-infiammatorie da parte del tessuto adiposo. Infine, molteplici studi dimostrano che la

formazione di ADA influenza il livello sierico di farmaco (38).

### **FATTORI CHE INFLUENZANO LA FORMAZIONE DI ADA**

I fattori associati alla produzione di ADA non sono ancora completamente chiari, ma alcuni studi riportano un'associazione significativa tra ADA e l'età dei pazienti, ma anche il tipo, la durata e la severità della malattia, la frequenza e il dosaggio di somministrazione del farmaco, eventuale terapia concomitante con gli immunosoppressori (3). Anche l'analisi sviluppata nella nostra revisione mostra come la somministrazione di methotrexate sembrerebbe ridurre la frequenza di formazione di ADA (RR 0,65, 95% IC da 0,47 a 0,9), soprattutto per i pazienti affetti da AR, CD e AS (27).

### **MONITORAGGIO TERAPEUTICO DEI FARMACI E DEGLI ADA**

Data l'associazione tra la formazione di ADA e la riduzione dell'efficacia terapeutica degli inibitori del  $TNF\alpha$ , il monitoraggio terapeutico di entrambe le molecole potrebbe essere d'aiuto nel processo decisionale. L'implementazione del monitoraggio richiede la standardizzazione dei metodi di determinazione e accordo nell'interpretazione dei risultati (39). Data la relazione tra la formazione degli ADA, la risposta terapeutica, i livelli sierici degli inibitori del  $TNF\alpha$  e la risposta clinica riportata in molti studi, sta maturando la convinzione che il monitoraggio possa favorire le scelte terapeutiche più appropriate per ridurre la perdita di risposta ed evitare l'immunogenicità (40). Il principale problema relativo al monitoraggio è l'identificazione del livello minimo di farmaco nel siero associato alla risposta clinica, in quanto i dati disponibili derivano da studi eterogenei in termini di popolazione studiata, determinazioni ed "endpoints" (41). Diversi algoritmi sono stati proposti per interpretare i risultati generati dai laboratori clinici (3, 40, 42-45). In generale, gli autori concordano nel suggerire la determinazione dei livelli sierici sia del farmaco sia degli ADA. Questo consente, nei pazienti che rispondono alla terapia con gli inibitori del  $TNF\alpha$ , il dosaggio o sospendere il farmaco, mentre i pazienti che non rispondono alla terapia potrebbero trarre vantaggio dalla modifica del trattamento in presenza di ADA, o dal cambiamento della tipologia o dosaggio del farmaco in caso rispettivamente di assenza di ADA o livelli di farmaco insufficienti (Tabella 2).

Il monitoraggio terapeutico degli anti- $TNF\alpha$  e degli ADA è importante in tutte le fasi della terapia, dall'induzione, alla fase di mantenimento fino alla remissione, in modo da garantire ai pazienti un'adeguata terapia e ridurre il rischio di perdita di risposta. Monitorare i livelli sierici del farmaco consente di limitare il rischio di sviluppare ADA, che si verifica solitamente in caso di livelli subottimali di anti- $TNF\alpha$  nella fase di induzione. Inoltre, una risposta immunogenica precoce, che guida la clearance del farmaco neutralizzandone l'effetto,

**Tabella 2**

Proposte di algoritmi per la valutazione del monitoraggio sierico degli anticorpi anti-farmaco (ADA) e dei farmaci inibitori del TNF $\alpha$

Pazienti che rispondono alla terapia con gli inibitori del TNF $\alpha$		Pazienti che non rispondono alla terapia con gli inibitori del TNF $\alpha$	
Alti livelli sierici di anti-TNF $\alpha$	Bassi livelli sierici di anti-TNF $\alpha$	Livelli sierici ottimali di anti-TNF $\alpha$	Livelli sierici insufficienti di anti-TNF $\alpha$
La riduzione del farmaco somministrato riduce il rischio di sviluppare eventi avversi	In presenza di ADA, sospendere la terapia con anti-TNF $\alpha$	ADA non determinabili o presenti in piccole concentrazioni, somministrare un farmaco diverso dagli anti-TNF $\alpha$	ADA non determinabili, incrementare la dose o la frequenza di somministrazione di anti-TNF $\alpha$
	In assenza di ADA, continuare con il regime terapeutico in atto	In presenza di livelli significativi di ADA, i pazienti possono trovare beneficio dal cambiamento del trattamento con un altro farmaco anti-TNF $\alpha$ diverso da quello già somministrato	

comporta il fallimento terapeutico primario. Nella fase di mantenimento, concentrazioni ottimali di farmaco sono associate ad un miglioramento dell'esito clinico, mentre nei pazienti in terapia con IFX è stato osservato che l'incremento individuale del dosaggio accresce la proporzione di pazienti in remissione clinica (46).

Per garantire un adeguato monitoraggio degli inibitori del TNF $\alpha$ , è fondamentale anche definire i livelli soglia ottimali entro i quali dovrebbero ricadere le concentrazioni dei farmaci. Per l'IFX tale valore è stato definito a 3,5  $\mu\text{g/ml}$ . Questo vuol dire che i pazienti che hanno un livello sierico di farmaco superiore a questa soglia potrebbero trarre beneficio dalla riduzione del dosaggio. Per ADL la concentrazione sierica intorno a 6-7  $\mu\text{g/ml}$  è considerata sufficiente (47, 48). Per gli altri farmaci ancora non sono stati individuati dei valori soglia ottimali, per cui ulteriori studi sono necessari per stabilirli.

## CONCLUSIONI

Le evidenze disponibili dimostrano la relazione tra la formazione di ADA e la riduzione della risposta terapeutica in pazienti affetti da una patologia infiammatoria cronica che determina risultati clinici insoddisfacenti. Il monitoraggio terapeutico degli inibitori del TNF $\alpha$  e degli ADA può pertanto offrire un valore aggiunto nel percorso diagnostico-terapeutico, ottimizzando i trattamenti e riducendo così il rischio di eventi avversi. Tuttavia il significato clinico dell'immunogenicità e la variazione della concentrazione sierica degli inibitori del TNF $\alpha$  sono ancora difficili da interpretare sia per la mancanza di standardizzazione dei metodi di determinazione sia per la definizione dei range terapeutici ottimali che dipendono dalle diverse patologie e dagli endpoints clinici valutati, come comunque avviene anche nel monitoraggio terapeutico di molti farmaci di più comune e tradizionale utilizzo.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:49-62.
- Nielsen OH, Ainsworth MA. Tumor Necrosis Factor inhibitors for inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2013;369:754-62.
- Vincent F, Morand E, Murphy K, et al. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinica perspective. *Ann Rheum Dis* 2013;72:165-78.
- Atzeni F, Talotta R, Salaffi F, et al. Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev* 2013;12:703-8.
- Vujanovic NL. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity. *Immunol Res* 2011;50:159-74.
- Feldmann M, Steinman L. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature* 2005;435:612-9.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008;117:244-79.
- Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, et al. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2010;49:1215-28.
- Juhász K, Buzás K, Duda E. Importance of reverse signaling of the TNF superfamily in immune regulation. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;9:335-48.
- Scott DL, Kingsley GH. Tumor Necrosis Factor inhibitors for Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2006;355:704-12.
- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.
- Willrich M, Murray DL, Snyder MR. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases. *Transl Res* 2015;165:270-82.
- Singh JA, Saag KG, Bridges SL Jr, et al. American College of Rheumatology Guideline for the treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:1-26.
- Jung-Tai L, Horng-Ming Y, Shyun-Yeu L, et al. Psoriatic arthritis: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *World J Orthop* 2014;5:537-43.
- Ritchlin CT, Colbert RA, Gladman DD. Psoriatic arthritis. *N Engl J Med* 2017;376:957-70.
- Maksymowych WP. Ankylosing spondylitis - at the interface of bone and cartilage. *J Rheumatol* 2000;27:2295-301.
- Olivieri I, Salvarani C, Cantini F, et al. Ankylosing spondylitis

- and undifferentiated spondyloarthropathies: a clinical review and description of a disease subset with older age at onset. *Curr Op Rheumatol* 2001;13:280-4.
18. Gorman JD, Sack KE, Davis JC Jr. Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor alpha. *N Engl J Med* 2002;346:1349-56.
  19. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012;380:1590-605.
  20. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2011;365:1713-25.
  21. Thalayasingam N, Isaacs JD. Anti-TNF therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2011;25:549-67.
  22. Ford AC, Sandborn WJ, Khan KJ, et al. Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:644-59.
  23. Ha C, Mathur J, Kornbluth A. Anti-TNF levels anti-drug antibodies, immunosuppressants and clinical outcomes in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;9:497-505.
  24. Taylor PC. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:308-15.
  25. Ordás I, Mould DR, Feagan BG, et al. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther* 2012;91:634-26.
  26. Vande Casteele N, Gils A, Singh S, et al. Antibody response to infliximab and its impact on pharmacokinetics can be transient. *Am J Gastroenterol* 2013;108:962-71.
  27. Pecoraro V, De Santis E, Melegari A, et al. The impact of immunogenicity of TNF $\alpha$  inhibitors in autoimmune inflammatory disease. A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2017;16:564-75.
  28. Minozzi S, Bonovas S, Lytras T, et al. Risk of infections using anti-TNF agents in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf* 2016;15:35-54.
  29. Garcês S, Demengeot J, Benito-Garcia E. The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a metaanalysis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1947-55.
  30. Maneiro J, Salgado E, Gomez-Reino J. Immunogenicity of monoclonal antibodies against tumor necrosis factor used in chronic immune-mediated Inflammatory conditions: systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med* 2013;173:1416-28.
  31. Nanda K, Cheifetz A, Moss A. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2013;108:40-7.
  32. Thomas S, Borazan N, Barroso N, et al. Comparative immunogenicity of TNF inhibitors: impact on clinical efficacy and tolerability in the management of autoimmune diseases. A systematic review and meta-analysis. *Bio Drugs* 2015;29:241-58.
  33. Tighe D, McNamara D. Clinical impact of immunomonitoring in the treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2017;23:414-25.
  34. Lombardi G, Perego S, Sansoni V, et al. Anti-adalimumab antibodies in psoriasis: lack of clinical utility and laboratory evidence. *BMJ Open* 2016;6:e011941.
  35. Yanai H, Hanauer S. Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD. *Am J Gastroenterol* 2011;106:685-98.
  36. Keiserman M, Codreanu C, Handa R, et al. The effect of antidrug antibodies on the sustainable efficacy of biologic therapies in rheumatoid arthritis: practical consequences. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:1049-57.
  37. Gils A, Vande Casteele N, Poppe R, et al. Development of a universal anti-adalimumab antibody standard for interlaboratory harmonization. *The Drug Monit* 2014;36:669-73.
  38. Fernandes C, Allocca M, Danese S, et al. Progress with antitumor necrosis factor therapeutics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Immunotherapy* 2015;7:175-90.
  39. Krieckaert C, Rispens T, Wolbink G. Immunogenicity of biological therapeutics: from assay to patient. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:306-11.
  40. Scott F, Lichtenstein G. Therapeutic drug monitoring of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2014;12:59-75.
  41. Felice C, Pugliese D, Papa A, et al. Therapeutic drug monitoring of anti-TNF- $\alpha$  agents in inflammatory bowel diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2015;15:1107-17.
  42. Carrascosa J. Immunogenicity in biologic therapy: implications for dermatology. *Actas Dermosifiliogr* 2013;104:471-9.
  43. Chaparro M, Guerra I, Muñoz-Linares P, et al. Systematic review: antibodies and anti-TNF- $\alpha$  levels in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:971-86.
  44. Yarur A, Rubin D. Therapeutic drug monitoring of anti-tumor necrosis factor agents in patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:1709-18.
  45. Garcês S, Antunes M, Benito-Garcia E, et al. A preliminary algorithm introducing immunogenicity assessment in the management of patients with RA receiving tumour necrosis factor inhibitor therapies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1138-43.
  46. Vande Casteele N, Gils A. Pharmacokinetics of anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: Adding value to current practice. *J Clin Pharmacol* 2015;55 Suppl 3:S39-50.
  47. Strik AS, Bots SJA, D'Haens G, et al. Optimization of anti-TNF therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Expert review of clinical pharmacology* 2016;9:429-39.
  48. Sirotti S, Generali E, Ceribellini A, et al. Personalized medicine in rheumatology: the paradigm of serum autoantibodies. *Auto Immun Highlights* 2017. doi: 10.1007/s13317-017-0098-1.

## QUANDO TI PORTI IL LAVORO A CASA: LEGGENDO “TOSSICOLOGIA! PERCHÉ CIÒ CHE NON CONOSCI TI PUÒ UCCIDERE”

TRADUZIONE ITALIANA DI MARIO PLEBANI E MARIELA MARINOVA

Alan HB Wu

Arborwood Glen, LLC, United States

Data di pubblicazione: 2017

ISBN-13: 978-0997368642

Pagine 264

Prezzo: € 13,21

Questo libro è l'ultimo volume di una Trilogia di testi di Alan HB Wu, un chimico clinico americano, professore di Medicina di Laboratorio dell'Università di San Francisco e membro del Medical Advisory Board del Centro dei Controlli dei veleni della California.

In modo divertente ed accattivante, l'autore descrive una serie di storie e di casi in cui un dato di laboratorio accurato e tracciabile aiuta nella soluzione di quesiti tossicologici riguardanti sostanze d'abuso e sostanze che ne mimano la positività ai test di screening, casi di intossicazioni e morti.

Non solo: si raccontano in una forma scanzonata errori di valutazione ed errori di laboratorio, valutazioni non corrette, offrendo sempre una soluzione che nasce dal ragionamento di un farmacotossicologo con grande esperienza.

Leggendo i casi descritti nel libro, ci si ritrova in situazioni comuni a molti laboratori di Farmacotossicologia Clinica e Forense e si sorride pensando a ciò che ci potrebbe accadere o che è accaduto e si trova lo stimolo ad imparare dagli errori propri e quelli altrui... ad esempio quelli riportati in questo libro.

Ed allora solo un professionista della medicina di Laboratorio, come Mario Plebani, che ha tanto studiato e prodotto sul ruolo degli errori, insieme alla collega Mariela Marinova, poteva riportare nella nostra lingua italiana e nel nostro linguaggio di laboratoristi situazioni, casi, storie riadattate da una realtà americana ad una narrazione più mediterranea.

Anziani intossicati da farmaci, false positività dovute a cross-reazioni o a metaboliti di farmaci, errori casuali e sistematici, preanalitici e postanalitici... il nostro pane quotidiano.

E così, anche se stanca per una giornata di lavoro trascorsa a dirimere situazioni e problemi di natura differente, dovuti alle tante sfaccettature delle dipendenze, è stato piacevole tornare a casa e sotto il sole di un alto promontorio tufaceo, che si inoltra nella valle dei calanchi, passare un fine settimana a leggere queste simpatiche pagine adattate alla nostra realtà lavorativa dall'amico Mario Plebani e dall'attenta collaboratrice Mariela Marinova.

E complimenti per aver trovato un po' di tempo per dedicarsi a questa scrittura tra i tanti affanni giornalieri.

*Ciò che non conosci ti può uccidere, ma la ricerca scientifica svolta all'eccellenza ringiovanisce!*

Buona lettura amici e colleghi!

Roberta Pacifici

Direttore Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Roma

